

医学专题丛书

核酸的结构及其生物活性

刘培楠 梁植权 沈同 主编

上海科学技术出版社



58173883
197

医学专题丛书

核酸的结构及其生物活性

(北京市生理科学会系统学术讲演)

刘培楠 梁植权 沈 同 主编

6417125

中科院植物所图书馆



S0011865

上海科学技术出版社

內 容 提 要

本书汇集北京市生理科学会于1962年春季举办的“核酸的结构及其生物活性研究的进展”系统学术讲演会上的14篇讲演稿，介绍近年来国内外在核酸研究方面的若干动向，内容涉及（一）核酸的结构问题，（二）核酸、核蛋白与蛋白质生物合成问题，（三）核酸的生物活性（感染、分化及致癌）问题，以及（四）影响核酸代谢的理化因素问题，可供生物化学专业人员以及广大医学界与生物学界工作人员参考。

医学专题丛书

核酸的结构及其生物活性

（北京市生理科学会系统学术讲演）

刘培楠 梁植权 沈 同 主编

上海科学技术出版社出版（上海瑞金二路450号）

上海市书刊出版业营业许可证出 093 号

上海洪兴印刷厂印刷

新华书店上海发行所发行

开本 850×1168 1/32 印张 11 28/32 排版字数 313,000

1964年9月第1版 1964年9月第1次印刷

印数 1-4,000

统一书号 13119·560 定价（科七）2.00 元

前 言

最近七八年中核酸的研究进展得很快，不仅是生物化学家对它关心，而是整个生物学界都对它感兴趣。因为这个阶段的核酸学术成就，不但丰富了核酸的化学知识（特别在核酸结构方面），而且开辟了新的研究途径，对于多少年来科学家切望解决的问题，如蛋白质生物合成的机制，病毒感染的本质，细胞分裂、分化、生长以及遗传的关键等，都提供了新的线索，使探讨生命现象的道路日渐明确，这对于生物学界不能说不是一件极其令人兴奋的事。

我国在核酸的研究方面正在开始，从事此项工作的科学家还不多。为了推动它的发展，北京市生理科学会于1962年春举办了“核酸的结构及其生物活性研究的进展”的系统学术讲演会，邀请在京的一部分从事有关核酸研究的科学家轮流介绍近年若干方面的进展情况，并组织了十次讨论。讲演的内容限于主讲人的兴趣与了解范围，只选择了下列四个问题：（一）核酸的结构问题；（二）核酸、核蛋白与蛋白质生物合成问题；（三）核酸的生物活性（感染、分化及致癌）问题；（四）影响核酸代谢的理化因素问题，共分为十五讲。讲演会结束之后，所有讲稿又经整理补充，汇编成为本书，其中韩锐同志所讲“抗肿瘤药与核酸代谢”一稿，因已在“生理科学进展”发表，本书中不再重刊。

核酸的研究发展很快，文献资料既多且广，本书所收集的材料势难全面，仅能作为北京地区部分科学工作者学术活动的记录而已。现应北京各界的要求，将其刊印，供从事有关问题的科学家参考。汇编工作中由于缺乏经验，缺点在所难免，敬希读者指正。

刘塔楠 梁植权 沈同 编

目 次

第一讲 核酸的化学降解及其产物的分离鉴定 胡炳晨

一、引言	1
二、核酸的降解	1
(一) 降解成碱基 2 (二) 降解成核苷 3 (三) 降解成核苷酸 4 (四) 降解成多核苷酸 4 (五) 无嘌呤酸和无嘧啶酸的制备 4 (六) 其他 6	
三、核酸降解物的分离与鉴定	9
(一) 纸层析法 9 (二) 纸电泳法 15 (三) 离子交换柱层析法 17 (四) 离子交换纸层析法 26 (五) 测定多核苷酸排列的工具酶及其特异性 26 (六) 多核苷酸的末端测定 28 (七) 单、二、三核苷酸异构体的鉴定 32	
四、结束语	35

第二讲 核糖核酸酶解作用的新进展 郭兆同

一、引言	41
二、核糖核酸酶	41
(一) 牛胰核糖核酸酶 41 (二) 核糖核酸酶 T_1 及 T_2 44 (三) 其他来源的核酸酶 47 (四) 核糖核酸酶对烟草花叶病毒核糖核酸降解 49	
三、磷酸双酯酶	51
(一) 蛇毒磷酸双酯酶 51 (二) 牛脾磷酸双酯酶 53	
四、磷酸单酯酶	55
五、结束语	56
六、补充	56

第三讲 核酸的结构 梁植权

一、引言	61
二、脱氧核糖核酸的结构	62
(一) 固体状态的观察 62 (二) 液体中的观察 69 (三) 脱氧核糖核酸的变性作用 80 (四) 脱氧核糖核酸的稳定性 89 (五) 脱氧核糖核酸的降解 90	
三、核糖核酸的结构	91
(一) 核糖核酸的 X 射线衍射分析 91 (二) 核糖核酸的核碱组成 92 (三)	

在溶液中核糖核酸的形状和大小 93 (四) Doty 等关于核糖核酸二級结构的“成环”假說 95 (五) Spirin 对核糖核酸三級结构的看法 99

第四讲 可溶性核糖核酸 吳冠芸

一、核酸和蛋白质生物合成的关系	104
二、可溶性核糖核酸的存在及其制备方法	105
(一) 超速离心法 105 (二) 整細胞法 106	
三、可溶性核糖核酸的理化性质与組成	106
四、可溶性核糖核酸的均一性、特异性及其提取	110
(一) 逆流分溶法 111 (二) 柱层离法 113 (三) 化学方法 113	
五、可溶性核糖核酸的结构与功能的关系	116
(一) 可溶性核糖核酸的末端结构与其接受氨基酸能力的关系 116 (二) 可溶性核糖核酸的一級结构与其接受氨基酸能力的关系 120 (三) 可溶性核糖核酸的二級结构与其接受氨基酸能力的关系 121	
六、可溶性核糖核酸有没有种族特异性	121
七、結束語	122

第五讲 核朊微粒与蛋白质的生物合成 刘培楠

一、微粒体的形态与核朊微粒的制备	127
(一) 微粒体的发现 127 (二) 微粒体的形状和大小 128 (三) 核朊微粒的制备 128 (四) 細胞核中的核朊微粒 129	
二、核朊微粒的生物化学性质	129
(一) 核苷酸組成 130 (二) 蛋白质及其氨基酸組成 131 (三) 酶活性 133	
三、核朊微粒的形态与其生化活性	134
(一) 核朊微粒的聚合与解离 134 (二) 不同大小核朊微粒的代謝活性 141	
四、蛋白质生物合成中核朊微粒的特异作用	143
(一) 氨基酸并合过程中核朊微粒的特异作用 144 (二) 特异蛋白质合成中核朊微粒的特异作用 145 (三) 核朊微粒的特异作用与其中核糖核酸结构的关系 148 (四) 細胞质中核朊微粒的特异性的来源 149 (五) 細胞核中的核朊微粒与蛋白质合成 150	

第六讲 遗传信息的传递者——信使核糖核酸 蔡良琬

一、引言	157
二、信使核糖核酸的发现及其性质的研究	159
(一) 信使核糖核酸的发现 159 (二) 信使核糖核酸的某些特性 160	
三、信使核糖核酸的合成与相应脫氧核糖核酸的复制关系	166

(一) 核糖核酸由脱氧核糖核酸复制而来的理论与实验根据 166	(二) 信使核糖核酸与相应脱氧核糖核酸的杂交键的形成以及天然核糖核酸-脱氧核糖核酸杂交键的发现 168
四、信使核糖核酸与蛋白质合成上的关系	169
(一) 核酸在蛋白质合成上的作用 169	(二) 天然及人工信使核糖核酸在蛋白质合成上的作用 169
(三) 应用人工高聚核糖核苷酸对蛋白质合成的密码复制作用的研究 171	
五、結束語	173

第七讲 具有生物活性的高分子核糖核酸的提取方法 及其某些理化性质 黄华漳

一、引言	176
二、高分子核糖核酸的提取方法	178
(一) 酚法 178	(二) 去污剂法 182
(三) 热处理法 182	(四) 盐酸胍法 183
(五) 去污剂-酚并用法 183	(六) 氟碳化化合物法 184
三、核糖核酸提取过程中防止降解与变性的问题	186
(一) 核糖核酸酶的抑制 186	(二) 应避免的化学因素 187
(三) 应避免的物理因素 187	
四、提高核糖核酸制剂纯度的方法	187
(一) 蛋白质掺杂问题 187	(二) 其他掺杂物 191
(三) 几类除去掺杂物的方法 192	
五、具有生物活性的高分子核糖核酸的某些理化性质	194
(一) 分子大小 195	(二) 沉降行为 195
(三) 粘度 198	
六、核糖核酸的生物活性的检定及存在的问题	198
(一) 何谓生物活性 198	(二) 检验核糖核酸活性的体外系统方法举例 199
(三) 关于核糖核酸制剂的低活性的一些推想 200	

第八讲 烟草花叶病毒核酸与蛋白研究的进展 李祿先

一、引言	206
二、烟草花叶病毒的结构	207
(一) 病毒分子的结构 207	(二) 核酸的结构和性质 208
(三) 蛋白质的结构 217	
三、病毒核酸的生物活性	218
(一) 核糖核酸感染性的发现和肯定 218	(二) 病毒分子的重组 219
(三) 关于核酸活性的争论 220	
四、核酸结构的改变	225

(一) 改变核酸结构創造新品种 225	(二) 核酸的结构与蛋白质合成的关系 226
五、結束語	227
第九讲 感染性核酸——病毒生物学特性的基础 柳元元	
一、引言	231
二、病毒核酸与病毒感染性的关系	232
(一) 感染性RNA的分离和提取 232	(二) 提取感染性病毒核糖核酸的材料来源 233
(三) 影响感染性核糖核酸滴度的因素 237	
三、感染性核酸和病毒的遗传、变异的关系	243
(一) 感染性核糖核酸及其所合成的病毒与原毒株生物活性的差异 243	
(二) 不同毒株核酸结构的差异及其与蛋白质结构的关系 247	
四、病毒感染与宿主細胞內的核酸代謝	250
(一) 病毒感染对細胞核酸的含量和組成的影响 250	(二) 合成病毒核酸的基础材料 251
(三) 受染細胞內病毒核酸和蛋白质生物合成的相互关系 253	
第十讲 核酸对細胞分化的作用 薛社普	
一、引言	261
二、胚胎分化过程中核酸与蛋白质的合成状态	262
(一) 核酸及蛋白质合成与胚胎形态形成的关系 262	(二) 变态过程(器官組織分化阶段)中核酸与蛋白质的代謝 265
三、胚胎誘导物的化学性质和核酸的胚內誘导作用	269
(一) 組織者的命名及其化学性质 269	(二) 組織者的核酸与蛋白质代謝 271
(三) 外源核酸及蛋白质的胚內誘导作用 274	
四、外源核酸及核蛋白对离体胚层細胞及肿瘤細胞分化的誘导作用	274
(一) 核蛋白的誘导作用 276	(二) 核糖核酸的誘导作用及其对細胞分化的影响的新近資料 279
五、結束語	287
第十一讲 核酸与肿瘤病因的关系 刘士廉	
一、引言	294
二、核糖核酸与細胞生长和分化的关系	295
三、脫氧核糖核酸与細胞变异和遗传的关系	298
四、肿瘤病毒病因及致癌活性核酸的研究	301
五、結束語	304
第十二讲 电离輻射对核酸代謝的影响(一) 陆如山	
一、引言	308

二、电离辐射对脱氧核糖核酸代谢的影响	308
(一) 电离辐射对标记前体并合到脱氧核糖核酸中的影响 308	
(二) 电离辐射对脱氧核糖核酸中间代谢物含量的影响 313	
(三) 电离辐射对脱氧核糖核酸中间代谢物从体内排出的影响 314	
(四) 电离辐射对脱氧核糖核酸酶的影响 316	
三、细胞分裂周期中电离辐射对脱氧核糖核酸合成的影响	318
(一) 离体细胞培养 318	
(二) 再生肝 320	
四、电离辐射抑制脱氧核糖核酸合成的可能机制	322
(一) 电离辐射对磷酸化过程的影响 324	
(二) 电离辐射对脱氧核糖核酸合成酶系的影响 325	
(三) 电离辐射对脱氧核糖核酸合成引物的影响 326	
五、结束语	327

第十三讲 电离辐射对核酸代谢的影响(二) 沈 同

一、电离辐射对核酸代谢影响的三个不同水平的研究	333
二、电离辐射对脱氧核糖核酸水溶液的影响	335
(一) 水的电离 335	
(二) 脱氧核糖核酸分子的射线损伤 336	
(三) 射线对脱氧核糖核酸分子的直接作用和间接作用 337	
(四) 脱氧核糖核酸水溶液中的 O_2 和脱氧核糖核酸分子上的蛋白质杂质 338	
三、电离辐射对细胞核酸代谢的影响	338
(一) 细胞结构 339	
(二) 脱氧核糖核酸、核糖核酸和蛋白质等的代谢联系 339	
(三) 细胞机能和脱氧核糖核酸含量 339	
(四) 眼虫叶绿体上的核糖核酸碱基组成和光照的联系 340	
四、电离辐射对整体动物核酸代谢的影响	340
(一) 整体高等动物 340	
(二) 神经 341	
(三) 体液 342	
(四) 生物高分子的特异性 343	
五、结束语	343

第十四讲 抗代谢物与核酸代谢 王振纲

一、引言	345
二、抗代谢物与核酸代谢	346
(一) 嘌呤类抗代谢物 346	
(二) 嘧啶类抗代谢物 350	
(三) 叶酸类抗代谢物 355	
(四) 谷氨酰胺类抗代谢物 367	
(五) 磺胺药和乙氨嘧啶 369	
三、结束语	369

第一讲 核酸的化学降解及其 产物的分离鉴定

胡 炳 晨

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、引 言

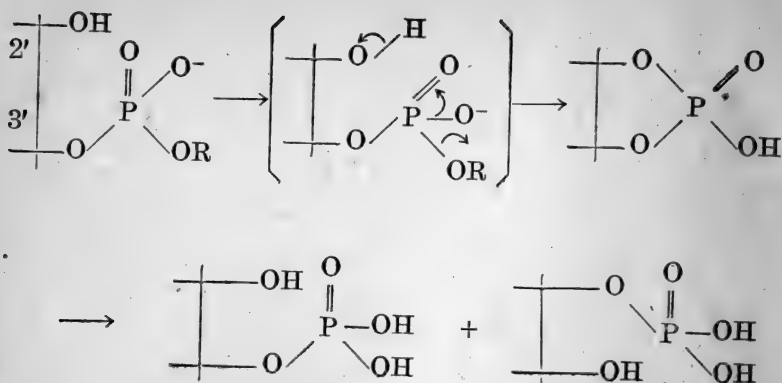
生命的基本功能——物质代谢和遗传，同构成生命物质基础的巨大分子系统蛋白质与核酸有密切关系。蛋白质和核酸功能上表现的特性，无疑取决于它们的化学结构，因此，为了解释不同来源的核酸功能上所表现的差异，研究核酸的结构，特别是一级结构，具有重要的意义。

核酸一级结构的研究通常可以通过合成与降解两途径。本讲介绍一些从降解入手研究核酸一级结构所用的一些方法，和近期进展的情况。

二、核酸的降解

核酸是由核苷酸通过磷酸酯键相互连接而成，核苷酸则由含氮碱（嘌呤和嘧啶碱）、核糖和磷酸所组成。因此，核酸在不同的降解条件下可以获得碱基、核苷、核苷酸以及多核苷酸等不同产物。欲得到这些产物，核酸的种类、降解的试剂与条件等都是重要的因素，总的来说，可以概括下列几个方面：

第一，由于碱降解的机制是经过环状磷酸中间阶段：



若化合物分子中靠近磷酸基处没有自由羟基(如脱氧核糖核酸,以下简称 DNA),即不易为碱水解,因此 1 N 碱在室温即能使核糖核酸(以下简称 RNA)降解成核苷酸,而 DNA 在相同条件下则降解极少。

第二, DNA 较 RNA 易为酸(如过氯酸、甲酸等)所水解,一般认为不论嘧啶或嘌呤核糖核苷均较其相应的脱氧核糖核苷难于水解。

第三,嘌呤的核苷键对酸较嘧啶的核苷键更不稳定, DNA 或 RNA 均具有此特性。

核酸的降解常应用的方法有化学(酸、碱和化学试剂)与酶等方法,本讲谈到的是一些化学方法;关于酶解的方法将在下一讲内述及。

(一) 降解成碱基

1. 过氯酸(70~72%)在 100 度加热 1 小时, RNA 或 DNA 均能水解成自由的嘌呤和嘧啶碱。Fresco 等^[89]报告本方法水解的效果与酸的浓度和水解的时间有很大关系(表 1)。过氯酸的浓度不合要求时,可用全磨口蒸馏仪器重蒸馏,收集沸点 203~205°C 的部分应用。但在蒸馏时易引起爆炸,需特别注意。此水解方法嘧啶回收量较低,5-羟甲基胞嘧啶在水解时会被破坏。

表1 过氯酸水解核酸的结果^[39]
(100°C)

核 酸	过 氯 酸 %	水 解 时 间					
		10'	20'	40'	60'	120'	180'
酵母·RNA	60	8.6	35	水 解 率		57	64
酵母 RNA	70	86	96	96	100	98	99
小牛胸腺 DNA	70	83	98	100	100	100	99

2. 甲酸(98~100%)175°C封管中加热2小时, RNA或DNA均可水解成自由碱基, 其缺点也为嘧啶回收量低, Wyatt等^[123]在水解大肠杆菌双数噬菌体DNA时改用88%甲酸175°C作用30分钟从而得到了5-羟甲基胞嘧啶。

3. 1N盐酸或硫酸100°C加热1小时, RNA水解后的产物是嘌呤碱及嘧啶核苷酸。此法缺点是在水解过程中嘧啶核苷酸可能会部分的转变成核苷。

4. 三氟乙酸于155°C加热80分钟(RNA)或60分钟(DNA)均可得到自由核碱。比较来看, 本方法较好, 胞嘧啶无脱氨现象; 封管加热时也较甲酸法产生的压力为小, 管不易炸裂; 纸层析时样品点样易干燥, 也无腐蚀滤纸的焦化现象。

在不同的水解条件下均要防止胞嘧啶可能发生的脱氨现象, Fresco等^[39]提出, 每m mole胞嘧啶和0.3毫升92%甲酸作用120小时(140°C)可以定量的由胞嘧啶转变为尿嘧啶。

(二) 降解成核苷 RNA降解成核苷的方法最早系用浓氨溶液在加压下于175~180°C作用3.5小时或在吡啶水溶液中回流4.5日而得到。近时, Hayes^[40]用50%甲酰胺水溶液于100°C作用10小时可得到A, G, C, U四种核苷, 其中除胞嘧啶核苷有20%脱氨外, 其余均较理想。用La(OH)₃在pH9于80~90°C加热48~60小时也可得到95%核苷^[31]。

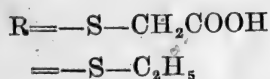
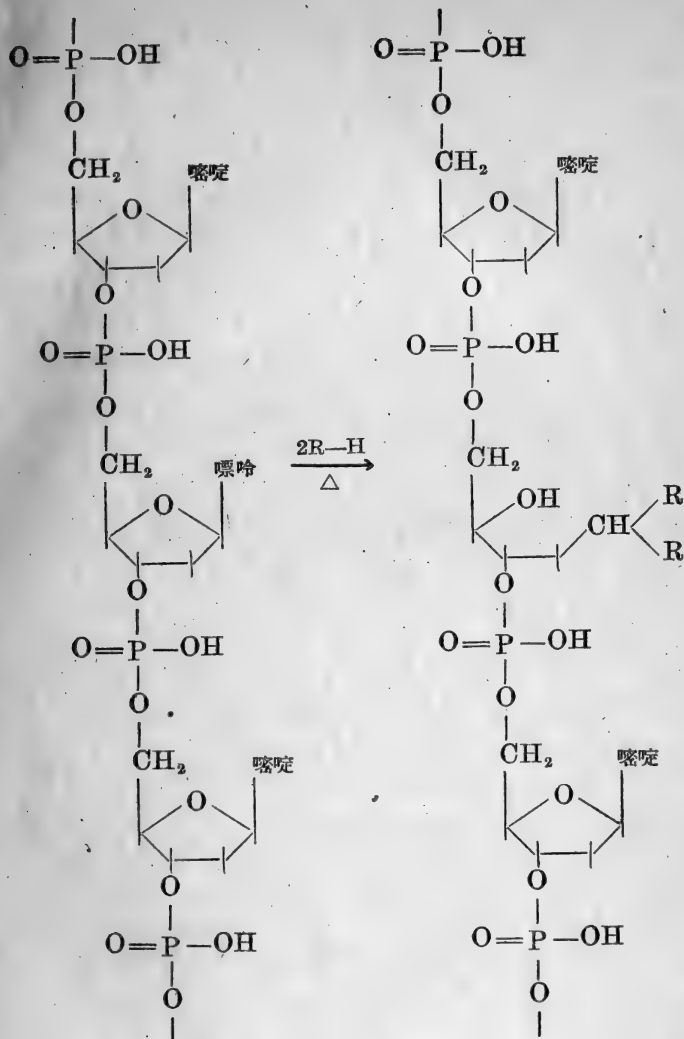
用化学方法自DNA制备核苷是相当困难的。

(三) 降解成核苷酸 RNA 經稀碱水解可得到单核苷酸，常用的方法是 0.3-1 N NaOH 或 KOH 在室温 37°C 作用 16~24 小时或 0.6 N Ba(OH)₂ 100°C 作用 2 小时，均能得到单核苷酸。Singer 等^[27, 98] 曾应用 0.3 N KOH 在 37°C 降解可溶性核糖核酸（以下简称 S-RNA），18 小时后得到单核苷酸。最近，也有人用更稀的碱水解而获得单核苷酸。Herbert 等^[46] 自鼠肝中分出三部分 S-RNA，以 0.1 N NaOH 在 85°C 水解 45 分钟比較测定了各部分的組成。

碱水解的方法較其他水解方法为完全，因此，曾被认为测定核酸組成中較为理想的水解方法。由于 DNA 不易为碱水解，同时嘌呤脫氧核苷的苷鍵又对酸很不稳定，所以也沒有較好的化学方法自 DNA 制备核苷酸。

(四) 降解成多核苷酸 降解成多核苷酸的試剂有酸和碱两种，随作用条件的不同可采用不同的浓度。Lane^[60, 61] 用 1 M KOH 26°C 水解 4~18 小时，从 RNA 得到了二核苷酸片段。Chargaff 等^[102] 以 0.1 M H₂SO₄ 100°C 水解 30 分钟，自 DNA 得到了五核苷酸。在較低的温度下采用浓度較高的酸，并适当的縮短了水解時間，也可得到多核苷酸。Merrifield^[79] 应用 6 N 盐酸于 25°C 水解酵母 RNA 3 分钟得到了二、三核苷酸。

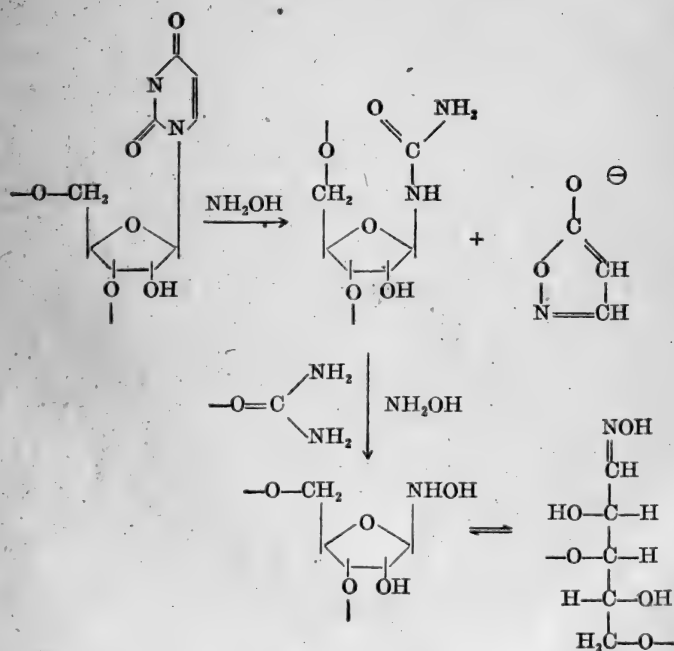
(五) 无嘌呤酸和无嘧啶酸的制备 由于嘌呤和嘧啶脫氧核糖核苷在稀酸的作用下苷鍵的稳定性有所差別。Chargaff 和 Tamm^[108, 110] 用稀酸处理 DNA 得到了不含嘌呤碱的多核苷酸，平均分子量約为 15,000，仅为 DNA 分子量的 1%，因此在研究核苷酸排列上較 DNA 容易。得到的这种酸常称之为无嘌呤酸 (APA)，其制备方法有四：(1) 用酸調节 pH 至 1.6 在 37°C 对水透析 24 小时；(2) 用酸調节至 pH 2.8 在 100°C 水解 1 小时；(3) DNA 在 HCl 存在下和乙硫醇作用 14 小时 (18°C)^[54]；(4) DNA 在无氯化鋅和硫酸鈉存在下和巯基乙酸作用 (37°C)^[60]，均可获得 APA。

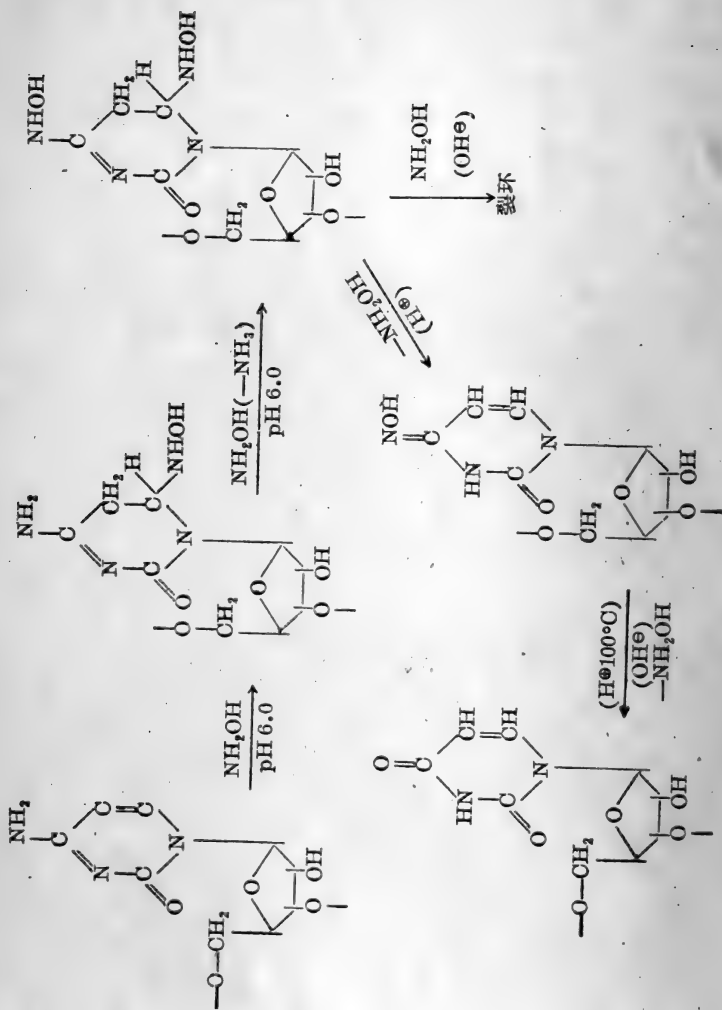


APA 除可用碱水解外^[51, 52], 尚可用酶水解, 核糖核酸酶^[85]、脱氧核糖核酸酶^[109]和鼠肝无嘌呤酸酶^[5]均可引起 APA 分解。

RNA 或 DNA 在 60°C 和胍反应 1 小时可得到无嘧啶碱的

尿嘧啶則較胞嘧啶的作用速度快 8 倍以上^[93]。Verwoerd 等^[115]分析了大腸桿菌 RNA 在 pH 10 于 37°C 与 6 M 脛胺作用后的产物，証明主要破坏了鏈中的尿嘧啶核苷酸。作用物再进一步用核糖核酸酶分解，酶可特异的仅在胞嘧啶核苷酸处切断。如此，适当控制反应条件，有希望获得較大的多核苷酸碎片。他們同时也較为詳尽的报告了脛胺对于尿嘧啶核苷及其核苷酸、胞嘧啶核苷及其核苷酸的作用結果。认为，在 pH 7.5 尿嘧啶核苷或核苷酸作用后，尿嘧啶可定量的为脛基取代而嘧啶环裂开，分解成核糖基-尿素和 5-异恶唑酮；在 pH 6.0 脛胺首先加成胞嘧啶核苷或核苷酸嘧啶环的 C₄-C₅ 双鍵，进一步以脛基取代 C₅ 氨基，以后繼續在酸性条件下作用則轉变成尿嘧啶核苷或核苷酸；但在碱性条件下則分解。





最近,有些工作者通过 DNA 在降解过程中的不同表现来推测核酸中核苷酸的大致排列。Burton^[16] 研究在不同胺的存在下以 66% 甲酸降解 DNA, 观察释放磷的速度。証明以二苯胺的效果最佳; 并发现无嘌呤酸在同样降解条件下释放磷的速度較 DNA 为快, 从而推想磷可能是从二个嘌呤核苷相連的磷酸二酯鍵中释放出来, 由此推論在与 DNA 或脫氧多核苷酸反应中可引起磷酸二酯鍵与嘌呤核苷残基开裂而释放出嘧啶多核苷酸借此推测嘧啶核苷酸的大致排列。

三、核酸降解物的分离与鉴定

核酸降解物的分离常用的方法有: 紙层析法、紙电泳法、离子交换柱层析法和离子交换紙层析法。有关这方面的工作有許多綜合文献可以参考: Wyatt^[124] 用紙上层析分离核酸組分; Markham^[76] 核苷酸及有关物质的色层分析; Cohn^[24] 核酸衍生物在离子交换柱上的层析分离等。

(一) 紙层析法 紙层析法是一种非常簡便的自一混合体系中分离各組分的方法, 方法原理以及操作步骤有很多书籍可資参考, 这里不再叙述。

紙层析法可将核酸各組分自混合体系中分离, 但在应用上有一定限度, 分离效果以分离小分子的組分如核碱、核苷、核苷酸以及二、三等低聚核苷酸为佳, 但在分离較大分子如四以上多核苷酸方面則应用較少。

推进剂的选择除应将被分离的組分清楚的分开外, 尚須符合以下条件: 第一, 易揮发; 第二, 不吸收紫外光。

• 1. 核碱的分离 核碱具有强烈吸收紫外光的能力, 核碱的紙上班点通过适当滤片可在紫外光下成暗色斑点而显示出来, 或将层析譜放在相紙上, 在适当条件下对紫外綫曝光, 均可得到分离圖譜。浓度在 0.5~1 微克/毫升可以检出。Markham^[69, 70], Smith^[99] Chargaff^[19] 和 Wyatt^[122] 提出分离 RNA 或 DNA 核碱的方法, 曾广泛为大家采用。表 2 是核碱在不同溶剂中的 R_f 值。

Marshak 和 Vogel^[77] 采用过氯酸水解, 可以不需从不含脂类的生物材料中将核酸用三氯醋酸提取分离出来, 即可进行核碱的微量分析。核碱的颜色反应, 对核碱从纸上检出极为重要, 因为这样可以避免由于含有能干扰一般分光光度测定的吸收杂质所引起的误差。有关这方面的工作 Wood^[121], Boser^[128], Gerlach^[129] 等有很多贡献。

表 2 核碱和核苷的 R_f 值^[124]

核碱与核苷	溶					剂				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
腺嘌呤	0.38	0.28	0.40	0.33	0.37	0.32	0.34	0.83	0.44	0.37
鸟嘌呤	0.15	0.11	0.15	0.13	0.16	0.22	0.22	0.70	0.02	0.40
尿嘧啶	0.31	0.19	0.33	0.39	0.38	0.66	0.74	0.67	0.73	0.76
胸腺嘧啶	0.52	0.35	0.50	0.56	0.52	0.76	0.84	0.78	0.73	0.74
胞嘧啶	0.22	0.24	0.28	0.26	0.32	0.44	0.21	0.80	0.73	0.70
5-甲基胞嘧啶	0.29	0.27	0.36	—	0.37	0.52	—	—	—	0.73
5-羟甲基胞嘧啶	0.13	0.12	—	—	0.25	0.44	—	—	—	0.75
腺嘌呤核苷	0.20	0.22	0.33	0.12	0.31	0.34	—	0.91	0.54	0.49
鸟嘌呤核苷	0.15	0.03	0.10	0.17	0.13	0.30	—	0.59	0.62	0.68
尿嘧啶核苷	0.17	0.08	—	0.25	0.31	0.64	—	0.60	0.79	0.84
胞嘧啶核苷	0.12	0.11	0.15	0.18	0.28	0.45	—	0.73	0.76	0.76

〔溶剂〕

1. 86%(v/v)含水丁醇, Whatman 1 号纸下行(Markham, Smith^[70])。
2. 86%(v/v)含水正丁醇, 另以 5% 容积的浓 NH_3 溶液(比重 0.88) 加于盛器底部, Whatman 1 号纸, 下行(Markham, Smith^[70])。
3. 正丁醇(在约 23°C 下以水饱和) 100 毫升, 15 N NH_4OH 1 毫升, Whatman 4 号纸, 上行(MacNutt^[66], Hotchkiss^[49])。
4. 正丁醇 77%, 水 13%, 甲酸 10% v/v/v, Whatman 1 号下行(Markham, Smith^[70])。
5. 异丙醇 85 毫升, 水 15 毫升, 28% 浓氨液 1.3 毫升, Whatman 1 号纸, 下行(Hershey^[48] 等)。
6. 异丙醇 170 毫升, 浓 HCl (比重 1.19) 41 毫升, 加水至 250 毫升, Whatman 1 号纸, 下行(Wyatt^[122])。
7. 三甲氨基 1 容积, 氨苯 2 容积以 1.5 容积水饱和, Schleicher 和 Schüll 第 597

号紙,下行(Vischer, Chargaff^[115])。

8. 异丁酸400毫升,水208毫升,25%氨水0.4毫升,Whatman 4号紙,下行(Löfgren^[63])。

9. 5% Na_2HPO_4 水溶液以异戊醇饱和,水相及非水相均置层析槽内,Whatman 1号,下行(Carter^[18])。

10. 水以1N NH_4OH 调节至pH 10, Whatman 1号,上行。

2. 核苷的分离 分离核苷所用的溶剂与核碱略同,在表2内Löfgren^[63]提出的溶剂可以将A,G,C,U四种核苷分开。近期,Venner^[131]用多种推进剂研究分离核苷。正丁醇-丙酮-水-吡啶-N-乙基-哌啶(20:25:7.5:0.75:0.75)和正丁醇-丙酮-水-哌啶(20:25:7.5:1.5)均可将A,G,C,U核苷分开,但仍不能用于定量测定。他们也提出用同一溶剂两次推进以分离核苷,如甲醇-盐酸-水(70:20:10)或甲醇-乙醇-盐酸-水(50:25:6:19)第一次层析,U,C核苷重叠不能分开,但当第二次用同样溶剂推进后A,G,C,U四种核苷即能清楚分离。

3. 核苷酸的分离 由于核苷酸的结构可能有三种形式,2',3'或5'-核苷酸,因此在分离上就带来了困难。一般认为A,G,C,U四种核苷酸的分离,紙层析法不如紙电泳法的效果好。Markham和Smith^[71]曾用一系列的溶剂在紙上分离核苷酸,饱和硫酸铵79%,水19%和异丙醇2% v/v/v的溶剂系统能分离二种腺嘌呤核苷酸和二种鳥嘌呤核苷酸,但对嘧啶核苷酸则不能满意的分开。Boulanger等^[138]提出用酚-异丙醇-甲酸系统定量分离A,G,C,U四种核苷酸,但结果不易重演。Caster^[18]的工作是很有价值的,他们用5% Na_2HPO_4 -异戊醇溶剂系统进行双向层析,可将大部分核碱、核苷和核苷酸分开。关于5'-核苷酸的分离,最近Moscarell等^[80]建议用异丙醇-乙醇-焦磷酸缓冲液(25:40:35 v/v/v)为溶剂,他们分离pA, pU, pC和pG取得了良好的效果。

s-RNA中新核苷酸的分离, Lipshitz^[62]和Brawerman^[10]等应用双向层析技术进行研究,s-RNA的碱水解物在Whatman 3毫米滤紙上双向层离,推进剂第一向为异丙醇-1N NH_4OH (7:3);第二向是异丁酸-0.5N NH_4OH (10:6) pH 3.6~3.7。

2',5'或3',5'-鳥嘌呤核苷酸, 2-N-甲基鳥嘌呤核苷酸, 6-N-甲基腺嘌呤核苷酸和假尿嘧啶核苷酸可以分离出来^[10]。

分离核苷酸常用的溶剂和层析条件(表3)。

表3 核苷酸的 R_f 值^[124]

核 苷 酸	溶 剂							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2'-腺嘌呤核苷酸	0.50	0.48	—	0.35	0.49	0.70	0.74	0.26
3'-腺嘌呤核苷酸							0.67	0.16
2'-鳥嘌呤核苷酸	0.46	0.43	0.20	0.67	0.24	0.46	0.79	0.50
3'-鳥嘌呤核苷酸								0.40
尿嘧啶核苷酸	0.80	0.77	0.51	0.43	0.24	0.35	0.85	0.73
胞嘧啶核苷酸	0.56	0.58	0.34	0.26	0.37	0.57	0.85	0.73
5'-腺嘌呤核苷酸	—	0.43	0.37	0.28	0.43	—	0.69	—
脱氧胞嘧啶核苷酸	—	0.64	—	—	—	—	—	—
胸腺嘧啶核苷酸	—	0.81	—	—	—	—	—	—

[溶剂]

- 叔丁醇在26°C时700毫升, 恒沸HCl 132毫升, 加水至1升, Whatman 1号紙, 下行(Smith, Markham^[99], Boulanger, Montreuil^[133])。
- 同表2,6。
- 丙酮75份(v), 25%(w/v)三氯醋酸25份(v), Whatman 1号紙, 上行(Burrows^[14]等)。
- 异戊醇, 四氢糠醇, 0.08 M 枸橼酸鉀緩冲液(pH 3.02)各1份(v), Whatman 1号紙下行(Carpenter^[17])。
- 异丁酸10份(v), 0.5 N NH_4OH 6份(v) pH 3.6~3.7, Schleicher, Schüll 597号紙, 下行(Magasanik^[67]等)。
- 90%含水酚84份, 叔丁醇6份, 甲酸10份, 水100份(均系体积), Whatman 1号紙, 下行(Boulanger, Montreuil^[133])。
- 同表2,9。
- 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液79份, 0.1 M 緩冲液(pH 6) 19份, 异丙醇2份, Whatman 1号紙, 下行(Markham, Smith^[71])。

4. 环状2',3'核苷酸的分离 Heppel 和 Whitfield^[41, 42]曾报告了环状2',3'胞嘧啶核苷酸的分离方法;关于腺嘌呤核苷、鳥嘌呤核苷、尿嘧啶核苷以及胞嘧啶核苷环状磷酸酯的分离可参

考 Brown^[11, 12] 的工作。

5. 多核苷酸的分离 最初曾由 Smith, Allen^[100] 自核酸降解物中用异丁酸-氨和异丙醇-醋酸-水为溶剂, 双向层析分离出多核苷酸。Khorana^[59] 采用氨系统推进剂分离多聚体 T(Poly T)以及多聚体 T 和 C(Poly T 和 C)。首先将分离物通过 Dowex-50 离子交换柱转变成铵盐后, 以异丙醇-氨水-水(7:1:2 v/v/v)或乙醇-1 M NH₄AC (pH 7.5)(5:2 v/v)将二至四核苷酸分离; 异丁酸-1 M NH₄OH-0.1 M EDTA (100:60:1.6 v/v/v) 长时间层析将五至九核苷酸分离。Rushizky^[88] 等用 RNase T₁ 降解酵母 RNA, 在含有 40%(NH₄)₂SO₄ 的 0.1 M 磷酸钠缓冲 pH 7 中分离出一、二、三核苷酸片段(表 4)。

表 4 酵母 RNA 经 RNase T₁ 降解分离的
单、二、三核苷酸 R_f 值^[88]

化 合 物	R _f (以 Ap 为 1.0)
G-Cyclic-p	1.5
Gp	2.5
ApGp	0.95
CpGp	2.5
UpGp	2.5
ApG-Cyclic-p	0.6
CpG-Cyclic-p	1.7
UpG-Cyclic-p	1.7
ApUpGp	0.68
UpApGp	1.1
UpCpGp	1.8
CpUpGp	1.8
UpUpGp	1.8
ApApGp	0.5
CpCpGp	1.9
ApCpGp	0.83
CpApGp	1.3

Staehelin^[106] 研究了二、三核苷酸异构体用单酯酶脱去末端 3'-磷酸单酯后的纸层析行为。在正丙醇-NH₃-H₂O (60:30:10)

溶剂中,二、三核苷酸异构体具有不同的 R_f 值(表 5)。

表 5 二、三核苷酸以单酯酶脱去末端 3'-p 后的 R_f 值^[106]

化 合 物	R_f (以 Ap 为 1.0)
ApC	1.6
ApU	1.3
GpC	0.88
GpU	0.73
ApApC	0.93
ApApU	0.80
GpApC	0.46
ApGpC	0.51
GpApU	0.41
ApGpU	0.45
GpGpC	0.29
GpGpU	0.22

核酸降解物的分离图谱除了可借其不同的光谱性质鉴别外,尚可以和已知的标准品在不同溶剂系统进行层析比较,以进一步肯定。纸层析法除用于定性以外,也可用于定量。方法是将层析谱在纸上标出后,再剪下各点以适当溶剂将分离物洗脱,洗脱液在适当波长用分光光度计测定吸收值,即可计算出各组分的含量^[9]。但应用这种方法测定时,由于必需经过层析分离和洗脱等步骤,因而测定时间需要较长(50 小时左右),测定回收率波动较大;纸上杂质的干扰影响测定的重复性也较难恒定,故想得到准确结果必须进行多次重复。许多工作者为克服上述缺点,多研究核酸组分不经分离的直接测定法。Kerr^[55], Loring 等^[64, 65] 先用银盐沉淀法将 RNA 降解物分离成嘌呤和嘧啶两部分,再分别测定每部分两处波长的光密度值,借二元联立方程求解出 A, G, C, U 核碱的含量。Emanuel 和 Chaikoff^[37] 以类似的方法分析了 DNA 核碱的含量。从四元混合体系直接测定核酸组成的工作近期也有很大发展。Suzuki^[107] 通过溴化作用使 RNA 的组分改变结构造成组分相互间的光谱差异,曾找到混合体系中各核碱或核苷的含

量。但此方法尚未应用到核酸样品。Reid^[83], Pratt^[84] 等人报告在更多波长处直接测定 RNA 或多核苷酸水解液的吸收值, 利用矩阵分析克服了线性联立方程组原理用于多元体系的困难。他们借电子计算机帮助直接计算出混合体系中核碱或核苷酸的含量。Василенко^[8] 等也用最小二程方原理提出了直接测定 RNA 核苷酸的方法。刘承斌等^[1, 2, 8] 利用混合体系在一定波长下的总吸收值(D)等于体系中各组分吸收值(Di)之和的原理:

$$D = \sum_{i=1}^n D_i$$

以及 RNA A, G, C, U 或 DNA A, G, C, T 四种核碱在 pH 1 及 pH 13 的溶液中于不同波长处的光密度差值, 直接求解出各核碱的含量。Fredericq 等^[88] 发现在 DNA pH 3 的缓冲液中 E 260/E 280 比值有随 A 或 T 核苷酸的克分子比例不同而改变的特点, 利用此一性质, 报告了简便推算 DNA 组成克分子比例的方法。Udenfriend 等^[118] 研究了在 pH 11 的溶液中鸟嘌呤的荧光光谱性质, 找出了测定鸟嘌呤含量的简易方法。此外, 也有借与试剂呈色的比色法^[91, 101], 和利用放射性同位素标记物的同位素稀释法测定尿嘧啶和胸腺嘧啶含量的方法^[89]。但这些方法在一定程度上受到测定条件的限制, 实际上较少采用。

(二) 纸电泳法 上面已经谈到用酸水解核酸测定组成的方法存在着一定的缺点, 而碱水解核酸成单核苷酸的方法则较为理想, 因此, 以纸电泳法分离单核苷酸则显着相当重要^[90, 78]。A, G, C, U 四种单核苷酸可以用电泳法分离的主要依据是在 pH 3.5 时核苷酸的第一磷酸基(IP—OH)全部解离而第二磷酸基(IIP—OH)全部不解离; 氨基解离程度也因各含氨基的核苷酸的解离常数不同而有所不同(表 6)。

由于每一种核苷酸带有 1 负电荷(IP—OH), 所以净负电荷在 pH 3.5 时则为:

AMP	0.46	(1-0.54)
GMP	0.95	· (1-0.05)

CMP 0.16 (1→0.84)

UMP 1.00

表 6 A,G,C,U 核苷酸在 pH 3.5 时的解离度

核 苷 酸	PKa ₂	解 离 度
AMP	3.70	0.54
GMP	2.30	0.05
CMP	4.24	0.84
UMP	—	—

因此,在进行电泳时单核苷酸向正极移动的速度各异,其次序是: UMP>GMP>AMP>CMP, 可以达到良好的分离效果^[72]。5'-核苷酸有二顺邻位羟基可以和硼酸结合成较硼酸为强的酸,而在 pH 9.2 时净负电荷较高。Crestfield 等^[28]利用此特性在 pH 9.2 的硼酸缓冲液中将 5' 与 2', 3 异构体分开。在 pH 3.5 时可从尿嘧啶核苷酸的单、二、三核苷酸的相对移动度计算出纸上移动时的磨擦阻力^[74]。因为在 pH 3.5 时单、二、三核苷酸所带的净电荷不同,三种核苷酸受到的阻力也不同(表 7):

三核苷酸>二核苷酸>单核苷

表 7 尿嘧啶单、二、三核苷酸的纸上阻力

	核 苷 酸		
	—	二	三
相对移动度	1	1.4	1.5
净电荷	1	2	3
阻力(净电荷/相对移动度)	1	1.43	2

按表 7 数值和在某一 pH 值时各核苷酸的净电荷,可以计算出任何单、二、三核苷酸的移动速度。例如,在 pH 3.5 时 AG, AC 和 AAU* 的移动速度(以尿嘧啶核苷酸的移动速度为 1)如下:

$$AG = 0.46 + 0.95/1.43 = 0.99$$

$$AC = 0.46 + 0.16/1.43 = 0.43$$

* AG 为腺鸟二核苷酸; AC 为腺胞二核苷酸; AAU 为腺腺尿三核苷酸。

$$AAU = 0.46 + 0.46 + 1.0/2.00 = 0.96$$

由于二、三以上核苷酸相对移动速度的逐渐接近,电泳法应用在核酸降解产物分离上则有限制,以分离三核苷酸以下的组分较为适宜。Edström^[86]自组织的单一细胞提出 RNA,水解后电泳分离嘧啶和嘌呤组分,样品用量极少,可以达到 100~1000 微微克的超微量水平。

近时,也有将电泳和纸层析两种方法联合用来分离核酸酶解物,称之为“指纹法”。Rushizky 和 Knight 分离了 TMV-RNA 的 RNase 降解物^[86, 87]和 RNase T₁ 降解物^[89];酵母 RNA 的 RNase T₁ 降解物^[88]以及 s-RNA 的酶降解物^[90]。Herbert 等^[47]也用同样方法分离了肝 s-RNA 的 RNase 降解物。他们用的方法是第一向进行纸电泳分离,缓冲液为 0.08 M HCOOH (以 NH₄OH 调至 pH 2.7),第二向是下行纸层析,推进剂是 0.08 M NH₄COOH pH 3.8 叔丁醇 (1:1),在一张滤纸上同时可以将一些单、二、三核苷酸异构体分开。

Petersen^[82]将 DNA 用含有 2% w/v 二苯胺的 66% v/v 甲酸降解,应用纸电泳法分离了嘧啶多核苷酸。

(三) 离子交换柱层析法 以上谈到的方法多适用于少量样品的分离,分离大量的样品柱层析法则具有特殊的优点。离子交换树脂柱层析在近几年来发展很快,尤其是取代纤维素离子交换树脂的合成,对核酸降解物的分离,特别是较大核苷酸片段的分离提供了有利的条件。方法是在交换柱内,装入离子交换树脂,把降解液调节至适当 pH,通过层析柱,被分离的组分通过离子交换作用吸附在柱上,然后用含有竞争性离子的洗脱剂进行洗脱。洗脱液按一定体积连续收集,用分光光度计量一定波长下每一小份收集液的吸收值,并绘出吸收曲线。将同一峰内的洗脱液合并干燥,即得到不同的分离产物。洗脱液的浓度可以成阶段的增加,也可以连续不断的增加。选择适宜的洗脱剂对分离效果至为重要。洗脱剂内若含有某种盐时,从洗脱剂中回收分离物时则会增加困难,必须经过脱盐步骤始能获得纯品。因此,一般多采用盐酸或甲酸等

为洗脱剂。最近在一些工作中，曾选用易蒸发和易分解的盐类为洗脱剂如碳酸胺、碳酸氢铵、三乙胺等，收到较好的效果。

常用到的有两类离子交换树脂，即聚苯乙烯树脂和取代纤维素树脂，分述于后：

1. 聚苯乙烯树脂 系由不同量的二乙烯苯与苯乙烯共聚而得，常用的有 Dowex-1；Dowex-2（阴离子交换树脂）和 Dowex-50（阳离子交换树脂）等。采用这类树脂分离核酸降解物，以 Cohn 的工作最为出色。

(1) 核碱、核苷的分离：因为核碱、核苷分子内均含有不同的可解离的基团，故可用离子交换法来分离。在酸溶液中核碱 A, G, C 以及相应的核苷均带有一 NH_3^+ 基，可解离成阳离子，但 U, T 及其核苷则不能。Cohn^[20] 用氢型阳离子交换树脂 (Dowex-50) 分离了 A, G, C, U 四种核碱。Cohn^[21] 同样用 Dowex-1 阴离子交换树脂也达到相同的目的。主要是因为 G, U, T 以及相应的核苷均具有可解离成阴离子的 $-\text{NH}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-$ 基团。Anderson^[7] 等

用 Dowex-2 Cl^- 型树脂制备脱氧核苷，他们指出这类核苷在 Dowex-50 树脂上会发生分解。Cohn^[24] 分离核苷时发现，在硼酸盐存在时，可使吸着较弱的 C, A 核苷在阴离子交换树脂上吸着作用增强，因此不难分离。最近 Hayes^[40] 也用 Dowex-1 树脂分离了 RNA 以 50% 甲酰胺水解的产物，得到了核苷。

(2) 单核苷酸的分离：核苷酸具有可解离的磷酸基故可表现出与核碱和核苷颇不相同的离子交换特性。最早 Cohn^[20, 21] 将核酸碱水解液以 Dowex-2 树脂吸附用稀盐酸溶液洗脱，分离出 A, G, C, U 四种单核苷酸。其后，将 Dowex-1 树脂处理成醋酸型或甲酸型以醋酸钠或甲酸钠缓冲液洗脱，将 C, U 单核苷酸异构体分离^[22]；用相同树脂处理成氯型，以含有氯化钠的醋酸缓冲液 (pH 5.5) 分离了腺嘌呤核苷酸的异构体^[23]。最近，Cohn^[20] 用 Dowex-1 Cl^- 型 X^+ 以易蒸发的碳酸氢铵（分解点 60°C ）溶液洗脱分离了一、二、三磷酸核苷和单核苷酸及其异构体。假尿嘧啶核

苷酸存在于 s-RNA 中, Cohn^[25] 报告了应用 Dowex-1, HCOO⁻ 型分离假尿嘧啶的方法。

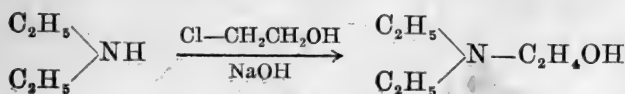
近期, 在 s-RNA 分子中也分离出一些新碱。Dunn 等^[24] 用 Dowex-1 树脂柱分离了大肠杆菌 s-RNA 0.3 N NaOH 水解的组分, 除得到 A, G, C, U 核苷酸外, 尚分离出胸腺嘧啶核苷酸、2-甲基腺嘌呤核苷酸, 6-甲氨基嘌呤核苷酸, 假尿嘧啶核苷酸和 1-甲基鸟嘌呤核苷酸。后两种核苷酸在用 HCl 水解时则没有获得。Cantoni 等^[27] 也以同样的分离方法自兔肝 s-RNA 中分离出五种新组分: 2-羟基-4-甲氨基嘧啶核苷酸, 1-甲基鸟嘌呤核苷酸, 6-甲氨基嘌呤核苷酸, 2-二甲氨基-6-羟基嘌呤核苷酸和假尿嘧啶核苷酸。

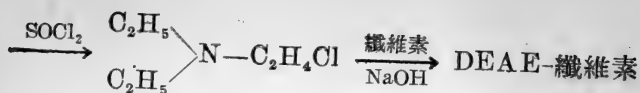
(3) 多核苷酸的分离: Singer^[27] 等报告将聚合体 A 酶解后, 用 Dowex-1 Cl⁻ 型 X³ 分离了 AMP——pApApApA 四聚体。他们采用的洗脱溶剂为 0.005 N—0.01 N HCl 溶液, 内含有不同量的 NaCl, 并提出分离后溶液内的 Cl⁻ 可借与 5% 三辛胺振荡后除去, 过剩的胺可用醚抽提去除。McCully 和 Cantoni^[78] 在 Dowex-1 柱上也研究了多核苷酸以磷酸单酯酶脱去末端 3'-p 后的分离效果, 他们将 s-RNA 用 RNase T₁ 降解, 以水和 0.3 N 甲酸阶段洗脱, 分出了 A, G 核苷和以 G 为末端的多核苷酸 (CpG, CpCpG, ApG)。

2. 取代纤维素离子交换树脂 这类树脂用于核酸降解产物分离工作常见到的有二种, 分述于后:

(1) Ecteola-Cellulose 系由环氧氯丙烷、三乙胺与纤维素粉在碱存在下相作用而得^[82], 其结构尚不清楚。Veder 等^[114] 曾进行了该树脂对一些离子亲和力的研究。

(2) Diethyl aminoethyl Cellulose (DEAE-Cellulose) 系自二乙胺开始经两步反应得 2-氯三乙胺, 再和纤维素作用而得^[82]。





Beers 等^[8] 将 Poly A 以牛胰 RNase 降解后, 在 Ecteola-Cellulose 树脂上吸附, 用 LiCl 溶液洗脱, 得到 Ap—ApApApAp 四个峰(图 1)。

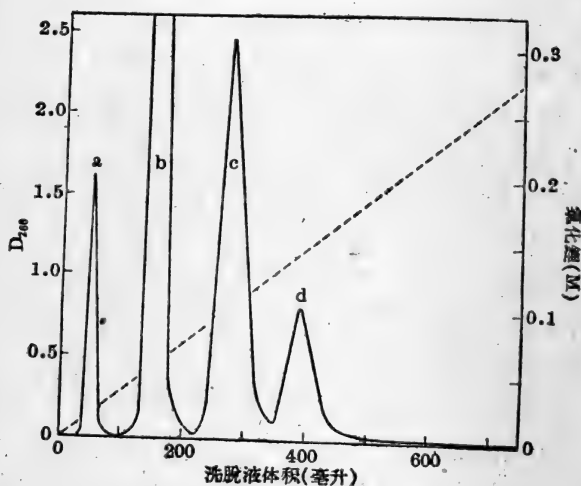


图 1 多聚腺嘌呤核苷酸经牛胰核糖核酸酶水解后产物的分离图谱^[8]

树脂: Ecteola-纖維素树脂 Cl-型(1.2×4.5 厘米)。

洗脱剂: 氯化锂溶液, 梯度洗脱法。

Staehelin 等^[104] 提出 DEAE-Cellulose 容易吸附低聚核苷酸, 并可在 pH 8.6 洗脱, 他们用 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 和 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 缓冲液(pH 8.6)为溶剂分离了 Poly A 降解物, 得到二至六核苷酸片段(图 2)。并以同样分离条件分离了牛胰 RNase 降解 RNA 的产物, 得到以下分离规律:

第一, 含 A 聚合体较含 G 聚合体早出现, 如 AC, AU 先于 GC, GU 洗脱下来。

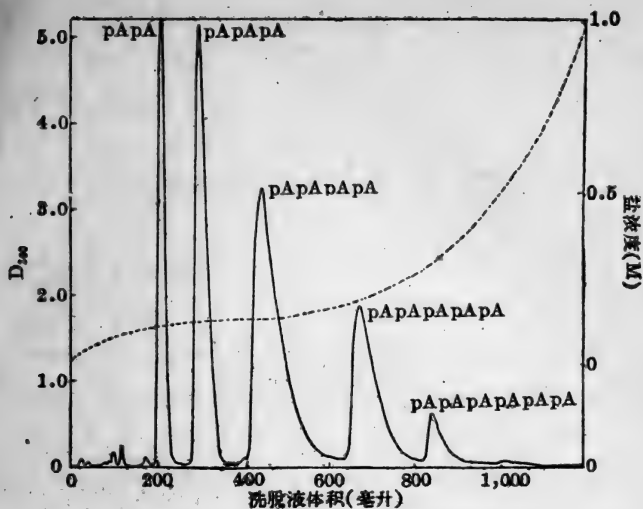


图2 多聚腺嘌呤核苷酸經固氮菌核糖核酸酶水解后产物的分离图谱^[104]

树脂: DEAE-纖維素树脂 (HCO_3^- 型) 230~325 篩孔, 0.9 meq N/g, 0.9×30 厘米。

洗脱剂: NH_4HCO_3 (pH 8.6) 逆度洗脱法。

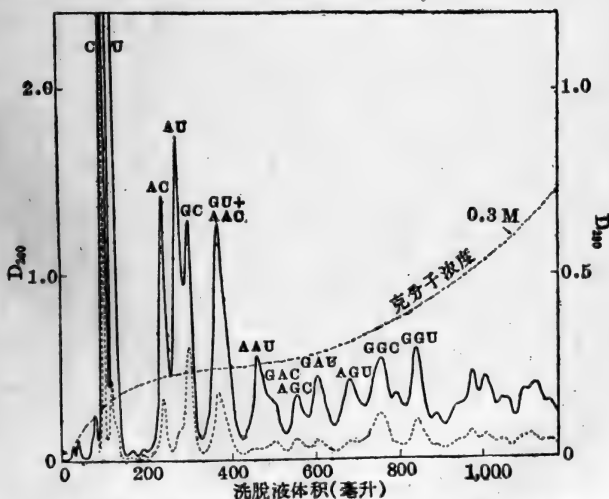


图3 牛胰核糖核酸酶水解酵母 RNA 后水解物分离图谱^[104]

树脂: DEAE-纖維素树脂 (HCO_3^- 型) 230~325 篩孔, 0.9 meq N/g。

洗脱剂: NH_4HCO_3 (pH 8.6) 逆度洗脱法。

—— 在 260 mμ 测定; - - - - 在 290 mμ 测定。

第二,在含同一种嘌呤的组分内,含C的聚合体较含U聚合体早出现,如 AC 先于 AU, GC 先于 GU 洗脱下来。

第三,在含G的聚合体中,G离末端嘧啶愈远者愈早出现,如 GAC 则早于 AGC; GAU 则早于 AGU(图3)。

在 pH 8.6 条件下不能清楚分离的组分如图3中 GU 与 AAC 等,可将洗脱条件调整至 pH 7.0 重新分离。

Tener 等^[111] 分别用 DEAE-Cellulose 和 Ecteola-Cellulose 树脂以 LiCl 为洗脱剂分离了 Poly T 五聚体(图4)。

在分离较大的多核苷酸组分方面,Khorana^[59] 进行了尝试,应用一种容易蒸发的盐——三乙胺重碳酸盐为洗脱剂,在 DEAE-Cellulose 树脂上成功的将 Poly T 降解物分离,依次获得一至十二核苷酸的分离产物(图5)。并在分离过程中发现数量相同的多

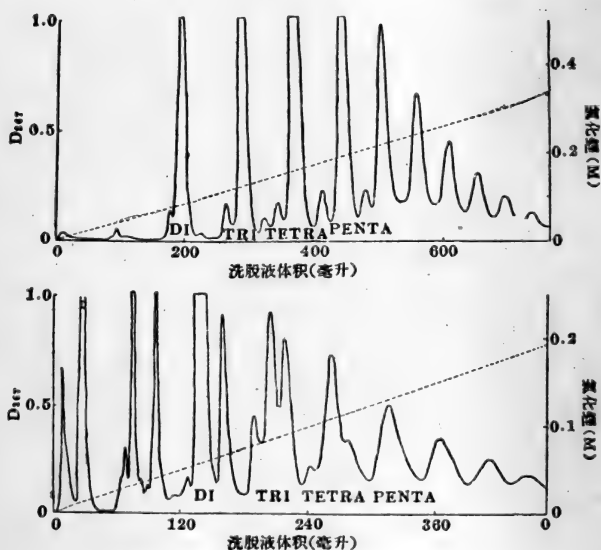


图4 多聚胸腺嘧啶核苷酸的分离^[111]

- (上) 树脂: DEAE-纤维素树脂 Cl-型 16.5×0.9 厘米。
洗脱剂: 氯化锂溶液梯度洗脱法, 流速 1.2 毫升/分。
- (下) 树脂: Ecteola-纤维素树脂 Cl-型 8×0.9 厘米。
洗脱剂: 氯化锂溶液梯度洗脱法, 流速 0.7 毫升/分。

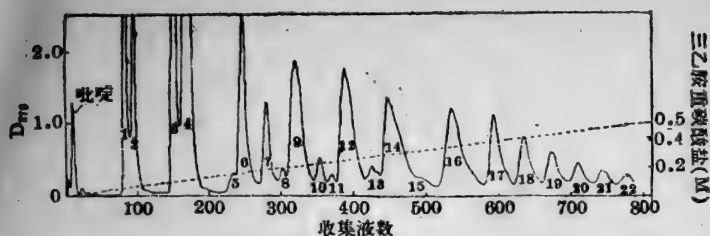


图5 多聚胸腺嘧啶核苷酸的分离图谱^[59]

树脂: DEAE-纤维素树脂 CO_3^- 型 (4×30 厘米)。

洗脱剂: 三乙胺重碳酸盐 (pH 7.5) 梯度洗脱法, 流速 2~2.3 毫升/分, 每 20 毫升洗脱液收集一次。

峰 2 产物,	环状 3',5' 胸腺嘧啶核苷酸;
峰 3 产物,	5'-胸腺嘧啶核苷酸;
峰 4 产物,	主要是环状二核苷酸;
峰 6 产物,	直链二核苷酸;
峰 7 产物,	环状三核苷酸;
峰 9 产物,	直链三核苷酸;
峰 10 产物,	环状四核苷酸;
峰 12 产物,	直链四核苷酸;
峰 13 产物,	环状五核苷酸和未测定物;
峰 14 产物,	直链五核苷酸;
峰 16 产物,	直链六核苷酸;
峰 17 产物,	直链七核苷酸;
峰 18 产物,	直链八核苷酸;
峰 19 产物,	直链九核苷酸;
峰 20 产物,	直链十核苷酸;
峰 21 产物,	直链十一核苷酸;
峰 22 产物,	直链十二核苷酸。

核苷酸环状者较直链者先洗脱下来。在相同条件下将第一次分离物再重分离即可得到纯品(图6)。重分离的产率不等, 为 52~95%。

最近, Staehelin^[105] 用 DEAE-Cellulose 进行了多方面的研究, 以碳酸氢铵为洗脱剂分离了一、二、三磷酸核苷(图7); 将高分子量的酵母 RNA 用 1 N KOH 在 28°C 水解 24 小时, 水解物以同样条件分离, 得到了单核苷酸及其异构体(图8)。异构体在柱层析分离不清的部分, 可再经过纸层法分开。酵母 RNA 的 RNase 解产物, 也可用这种条件分离, 得到单、二、三核苷酸的不

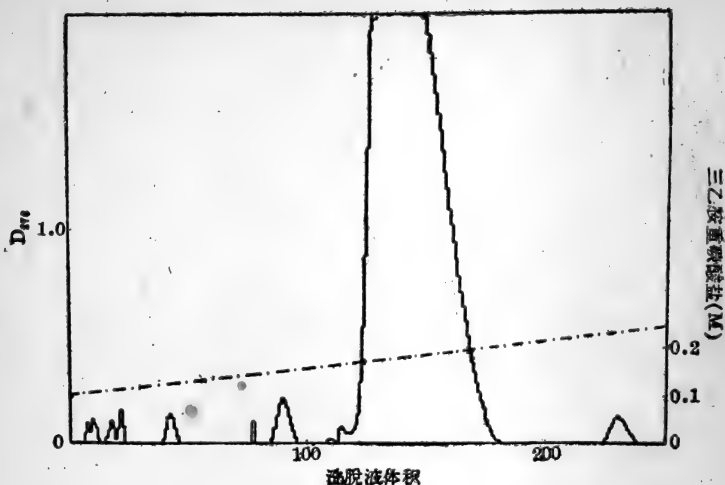


图6 四聚胸腺嘧啶核苷酸的再分离^[59]

树脂: DEAE-纤维素树脂 CO_2 型(2×20 厘米)。

洗脱剂: 三乙胺重碳酸盐缓冲液每10~15 毫升收集一次, 流速1毫升/分。

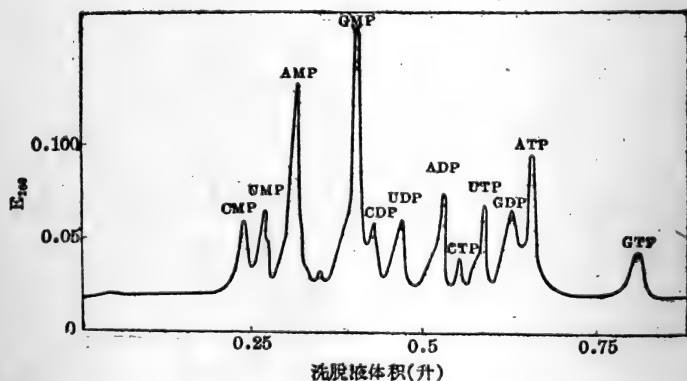


图7 单及多磷酸核苷的分离^[105]

树脂: DEAE-纤维素树脂(230~325 筛孔)。

洗脱剂: NH_4HCO_3 (0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 和 0.15 M 各 400 毫升) pH 8.6 梯度洗脱法, 流速 4 毫升/10 分。

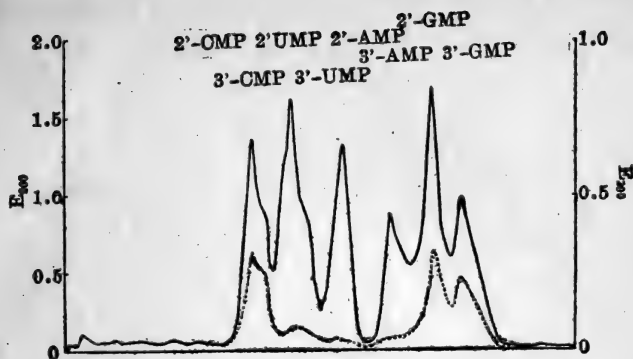


图8 单核苷酸及其异构体的分离^[105]

树脂: DEAE-纤维素树脂(50×1 厘米)。

洗脱剂: NH_4HCO_3 (0.01 M, 0.025 M, 0.05 M, 0.075 M, 0.1 M 和 0.125 M 各 400 毫升) pH 8.6 速度洗脱法。

——在 260 mμ 测定; ----在 290 mμ 测定。

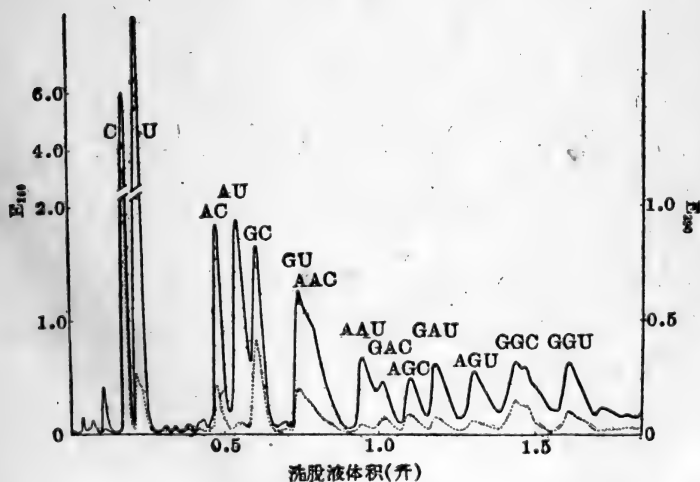


图9 高分子量酵母 RNA 经牛胰 RNase 水解后产物分离图谱^[105]

树脂: DEAE-纤维素树脂 50×1 厘米。

洗脱剂: NH_4HCO_3 (0.01 M, 0.24 M, 0.01 M, 0.2 M, 0.2 M, 0.4 M, 各 400 毫升) pH 8.6 流速 3.85 毫升/分。

同组分(图9)。酵母核酸的 RNase 降解物用单酯酶脱去末端 3'-p 后,仍可以在 DEAE-Cellulose 树脂分离^[106]。

Spencer 和 Chargaff^[103]将 20 毫克 DNA 用 0.1 M H_2SO_4 1 毫升在 100°C 水解 30 分钟,水解液调至中性,通过 1 克 DEAE-Cellulose 柱,以含有不同量氯化锂的 0.01 M 醋酸锂缓冲液 (pH 5) 洗脱,得到了一至八嘧啶核苷酸的片段(图 10)。

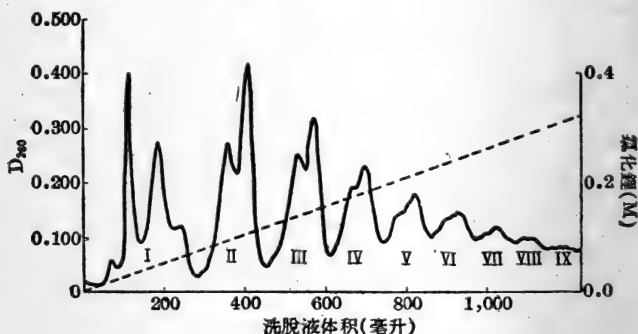


图 10 DNA 酸水解后多嘧啶核苷酸的分离^[103]

树脂: DEAE-纤维素树脂。

洗脱剂: 氯化锂在 0.01 M 醋酸锂缓冲液中, 最高浓度为 0.32 M (pH 5.0)。

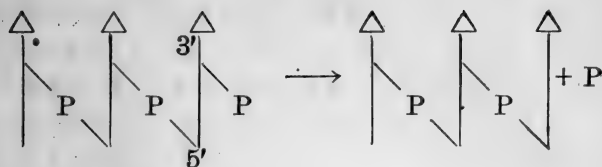
此外, Davey^[29] 最近在 TEAE-Cellulose 柱上用醋酸钠缓冲液 (pH 4.68) 和枸橼酸钠 (pH 4.72) 洗脱分离了 5'-核苷酸及其衍生物。

(四) 离子交换纸层析法 这是一种结合离子交换柱层析法和纸层析法的原理发展起来的一种方法, 具有纸层析简便易行的特点。此法在核酸降解物的分离工作中尚少应用, 在碱性氨基酸的分离上应用较广^[112], 具有一定的发展前途。Smillis^[98] 将 Amberlite XE-119 涂在纸上, 并处理成 $HCOO^-$ 型, 能将 A, G, C, U 四种单核苷酸清楚的分开。在分离中采用了两种推进剂, 3.8 N 甲酸可将 U, G 分开; 但不能将 C, A 分离, C, A 则在第二次推进时用 0.5 M 醋酸铵 (pH 5.0) 分开。

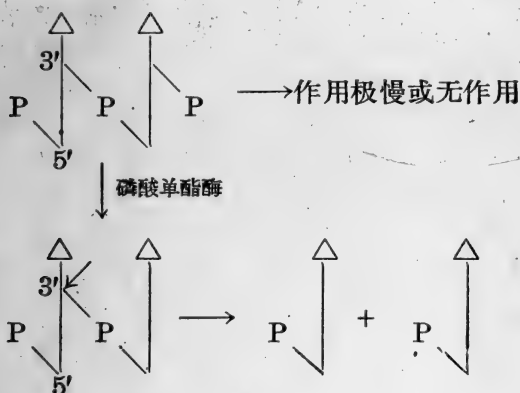
(五) 测定多核苷酸排列的工具酶及其特异性

1. 常用的工具酶的作用方式

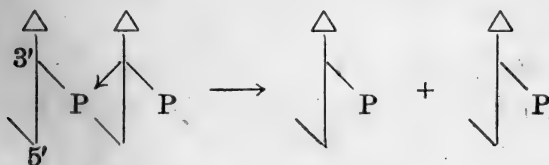
(1) 前列腺磷酸单酯酶:



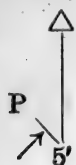
(2) 蛇毒磷酸双酯酶:



(3) 牛脾双酯酶:



(4) 蛇毒 5'-核苷酸酶:



2. 酶解产物

酶	底物	产物
牛胰 RNase ^[73]	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸
牛脾 RNase ^[53]	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸
牛脾 RNase ^[45, 68]	嘧啶环状核苷酸	2'-嘧啶核苷酸
	嘌呤环状核苷酸	2'-嘌呤核苷酸
鼠肝酸性 RNase ^[127]	嘧啶环状核苷酸	2'-嘧啶核苷酸
	嘌呤环状核苷酸	2'-嘌呤核苷酸
蛇毒磷酸双酯酶 ^[16, 56, 95]	多核苷酸	5'-嘧啶核苷酸
		5'-嘌呤核苷酸
牛脾磷酸双酯酶 ^[43]	多核苷酸	3'-嘧啶核苷酸
		3'-嘌呤核苷酸
牛肠磷酸双酯酶 ^[43]	嘧啶环状核苷酸	3'-嘧啶核苷酸
	嘌呤环状核苷酸	3'-嘌呤核苷酸
发芽大麦 3'-核苷酸酶 ^[94]	3'-核苷酸	核苷、磷酸
牛精 5'-核苷酸酶 ^[44]	5'-核苷酸	核苷、磷酸
蛇毒 5'-核苷酸酶 ^[44]	5'-核苷酸	核苷、磷酸
细菌 5'-核苷酸酶 ^[118]	5'-核苷酸	核苷、磷酸
酸性磷酸单酯酶 ^[91]	核苷酸	核苷、磷酸
骨磷酸单酯酶 ^[117]	核苷酸	核苷、磷酸

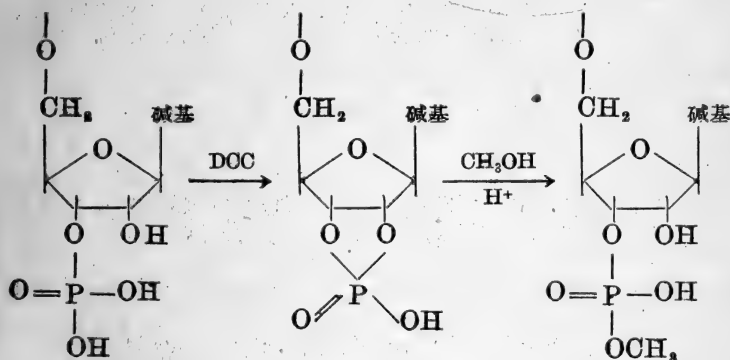
(六) 多核苷酸的末端测定 Markham 和 Smith^[76] 提出 RNA 末端可能有四种形式和它们的检出方法:

末端形式	检出方法
2' 或 3'-核苷酸	用 RNase 降解得到 2' 或 3'-嘌呤核苷酸时即可认为是末端。
核苷	先用无双酯酶和 RNase 活性的提纯前列腺单酯酶处理, 后以碱水解, 检出的核苷即为末端, 但有二种可能: 末端可能是 2' 或 3' 核苷酸或是核苷。为证实后者, 可直接用碱水解。
环状核苷酸	在一定条件 (55°C, 0.1 mg 酶/毫升 pH 7.6) 用 RNase 水解得到嘌呤环状核苷酸即为末端。

多核苷酸的末端测定也可参考这种方法。此外，由于一般末端核苷酸的特征不是一个磷酸单酯和一个自由的羟基就是存在着两个顺位的自由羟基，因此，尚可用化学方法标记末端进行测定。

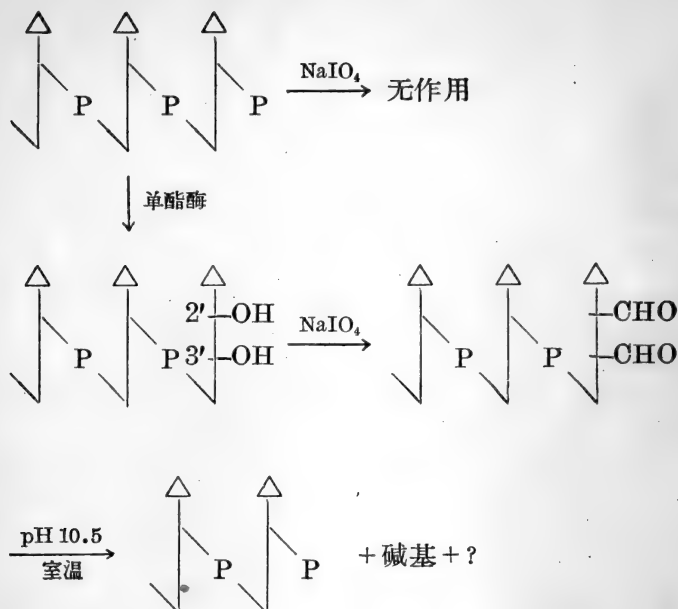
1. 3'-OH 乙酰化 Khorana^[58] 用醋酐和无水吡啶与以胸腺嘧啶核苷为末端的多核苷酸进行乙酰化反应，产物用蛇毒双酯酶分解，有乙酰基者即为末端。

2. 末端磷酸单酯甲基化 Khorana^[57] 提出一种末端磷酸甲基化的方法，一种多核苷酸的铵盐在 DCC (dicyclohexyl carbodiimide) 参与下于室温和甲醇作用，可得到末端甲基化的产物。

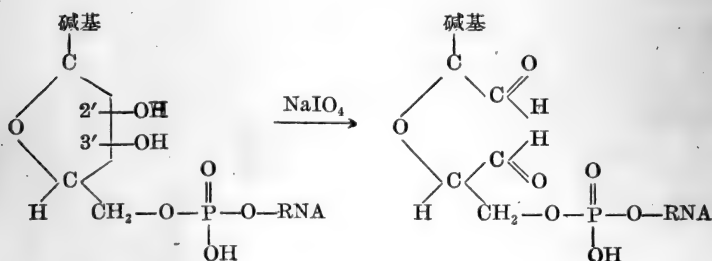


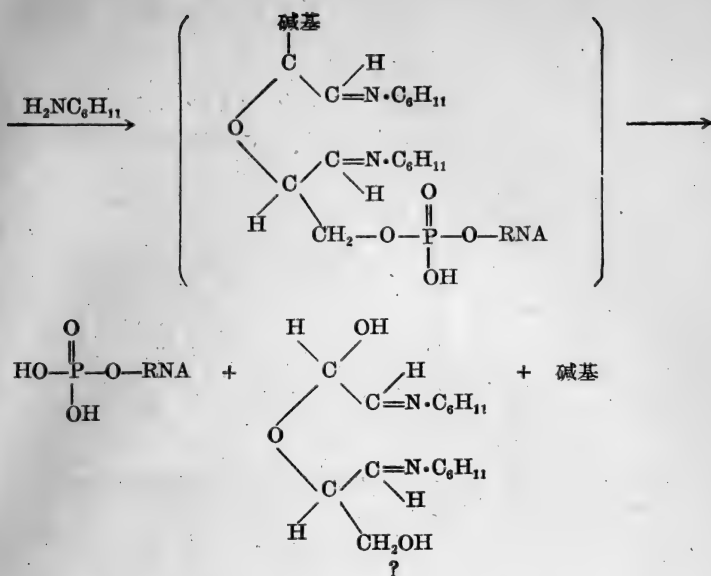
反应后的多核苷酸链，可用 RNase 和双酯酶联合降解鉴别末端。若以 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{C}^{14}$ 为甲基化剂，对末端的鉴别更为容易。

3. 过碘酸氧化末端核苷法 核糖 C'_2 , C'_3 两顺位羟基均呈游离状态时，可为过碘酸氧化成双醛基化合物。双醛化合物不甚稳定，在 pH 10.5 即行分解。若多核苷酸末端 C'_2 , C'_3 二顺位羟基呈游离状态时，可用此法鉴别末端，末端碱基可用纸层析法检出^[19, 110]。若末端存在 2' 或 3'-磷酸单酯时，必须借单酯酶脱除后始能氧化。



但这种方法仅适用于短链的多核苷酸，且末端核碱的脱落一般不能完全。Yu 等^[126]在这种方法的基础上作了进一步研究，末端经过碘酸氧化后再和环己胺作用，末端核苷脱落完全，核碱几乎定量的用纸层析法可以检出。从而有希望成为一种自末端逐步降解的方法。





作者将此方法用到酵母 s-RNA 的末端逐步降解上，連續两次降解得到的測定結果与用碱水解得到的符合。但这种方法对假尿嘧啶核苷則不起作用^[32]。

Dulbecco 等^[33] 提出用同位素标记物測定末端残基量的方法，末端被过碘酸氧化后和二分子的氨基硫脲 -S^{35} 作用，根据測定結合物的比放射性計算出末端残基的量。他們运用相同原理，报导了一种能在紙上反应的微量測定法，这种借紙电泳分离 S^{35} 标记物的方法，可适用于二核苷酸。

最近，Young 等^[125] 提出 pA, pApApA, pUpUpU 或 d-pCpCpC 在二异丙基碳化二亚氮存在下于 pH 8 介质中苯胺可与末端 5'-p 作用，得到 80% 的产率。这种反应在与 s-RNA 作用时也得到相同結果 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH-pGp} \dots$)。詳細反应条件尚无报告。胡等^[4] 发现 1-氟-2,4-二硝基苯在 4% 碳酸氢鈉溶液中与大肠杆菌 s-RNA 作用，DNP-可結合在 s-RNA 的末端 5'-磷酸上。借此可以研究 s-RNA 的非接受氨基酸一端核苷酸的排列。

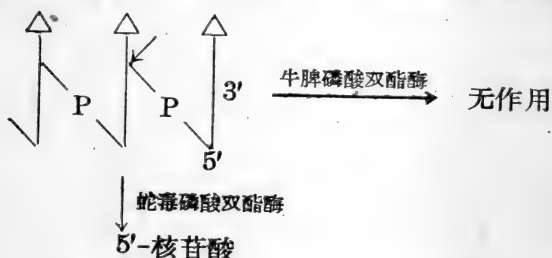
(七) 单、二、三核苷酸异构体的鉴定 核苷酸异构体的鉴定

对研究核苷酸排列顺序至为重要。下面介绍一些常应用的方法。

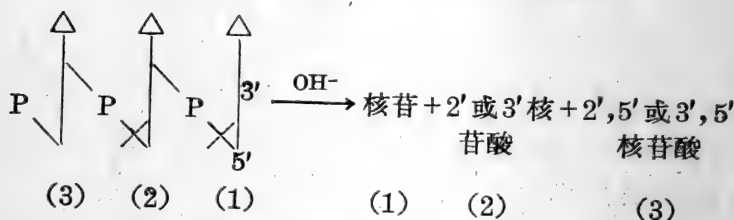
1. 鉴别末端 3' 或 5' 磷酸单酯法

(1) 末端无 3' 磷酸单酯者：

a. 可以通过蛇毒磷酸双酯酶和牛脾磷酸双酯酶降解鉴别。

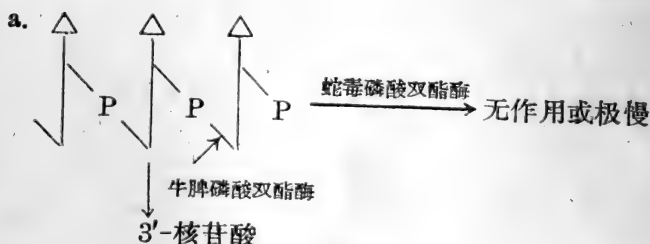


b. 可以通过碱水解, 分析降解物以确定末端结构。



c. 可以和 NaIO_4 作用成双醛化合物。

(2) 末端有 3' 磷酸单酯者：



b. 碱水解得到 2' 或 3' 核苷酸而无核苷。

c. 和过碘酸钠不起作用。

2. 二核苷酸异构体的鉴定 样品若为 ApCp 则可通过下列

步骤鉴别。

(1) 样品首先用前列腺单酯酶处理除去末端 3'-磷酸。

(2) 酶处理物用过量的 NaIO_4 氧化。

(3) 氧化后反应液加入环己胺, 层析分离, 根据层析谱鉴别出为 ApCp (图 11)。溶剂为异丙醇-水 (70:30v/v) 以 NH_4 饱和层析器。

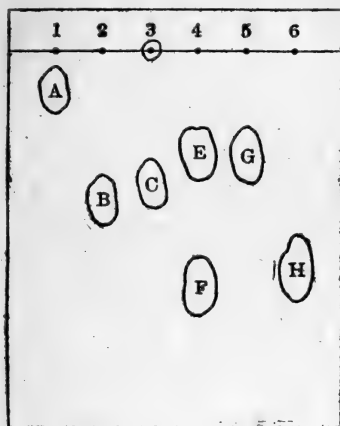


图 11 二核苷酸异构体的鉴定

1 = 样品 ApCp(A);

2 = 样品经酸性单酯酶处理后(B);

3 = 切去 3'-磷酸的化合物与 NaIO_4 作用产物(C),
原点遗留过剩 NaIO_4 ;

4 = 双酯化合物与环己胺反应后:

(E) 为腺嘌呤核苷-3'-磷酸,

(F) 为胞嘧啶碱;

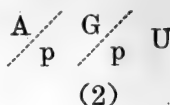
5 = 标准腺嘌呤核苷-3'-磷酸(G);

6 = 标准胞嘧啶碱(H)。

氧化后产物也可以不加入环己胺而在 pH 10.5 缓冲液中保温, 层析鉴别^[119]。

3. 三核苷酸异构体的鉴定 样品若为 GpApU, ApGpU 可通过下列步骤鉴别: 样品用蛇毒磷酸双酯酶降解, 以标准核苷及核苷酸作对照进行层析分离鉴别。层析推进剂为正丙醇- NH_4 -水(60:30:10)(图 12)。

样品經双酯酶处理后应依下列方式分解：



由层析結果分析，样品(1)(2)得到的分解产物，完全与以上情况符合，借此可以鉴定三核苷酸异构体。若样品末端带有 3'-磷酸时，可先用单酯酶脱去 3'-磷酸，再按上述方法鉴别。

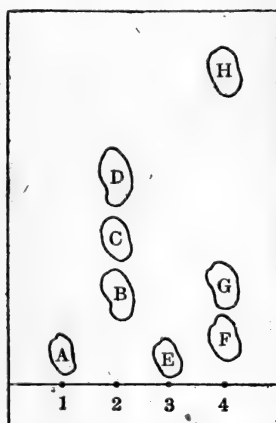


图 12 GpApU 与 ApGpU 經蛇毒磷酸双酯酶处理后紙层析分离图谱

- 1=样品 GpApU(A);
- 2=5'-UMP(B), 5'-AMP(C), G 核苷(D);
- 3=样品 ApGpU(E);
- 4=5'-GMP (F), 5'-UMP(G), A 核苷(H)。

最近，Rushizky 等^[88] 詳細的敘述了酵母 RNA 經 RNase T₁ 降解后分离出的单、二、三核苷酸系統分析的方法。

4. 多核苷酸的光譜分析 根据一种化合物的光譜性质特点，鉴别化合物的結構是广泛应用的一种方法。Staehelin^[105] 曾在 0.1 M NH₄HCO₃ (pH 8.6) 和 0.1 N HCl (pH 1) 溶液中进行 ApCp, ApUp, GpCp, GpUp 二核苷酸异构体紫外吸收光

譜的研究,它們之間具有显著差异,借此可以鉴别二核苷酸异构体的结构(图13)。

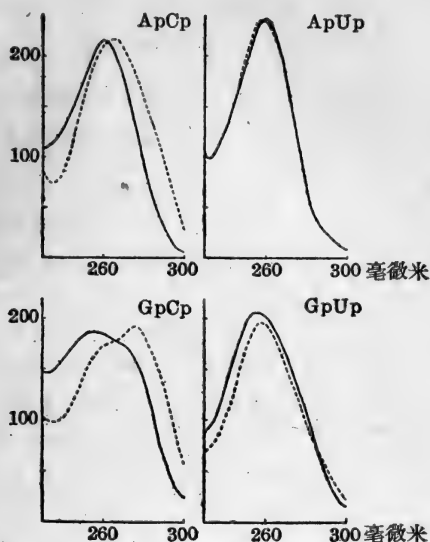


图13 二核苷酸的紫外綫吸收光譜 [105]

—— 0.1M NH_4HCO_3 pH 8.6; ----- 0.1N HCl (pH 1.0)。

四、結 束 語

近些年来对于核酸的降解方法,多核苷酸的分离以及核酸末端和核苷酸的排列順序等研究有了較大的发展。但对整个核酸分子来讲,了解清楚某一种核酸分子內核苷酸的排列順序仍有很大距离。目前仍处在找寻适宜方法的阶段。因为核酸的組成比較简单,各核苷酸均通过同样的磷酸双酯鍵相連,彼此間差异极小,如今尚缺少能破坏一定类型鍵的专一性强的酶制剂。因此,需要付出更大的力量来克服这些困难。

研究多核苷酸的分离和排列順序,均需要适宜大小的多核苷酸片段为材料。从降解入手分离出十个核苷酸以上的片断尚难做到,究其原因,可能在选择降解方法和条件时存在問題;或由于核

酸本身的结构所造成,究属何种原因尚有待进一步研究。

逐步化学降解是一种测定核苷酸排列顺序较为理想的方法,在每次降解末端时,如何保持原 RNA 链不断裂则是一个关键问题。在降解条件以及 RNA 的回收等步骤上也均需要进一步研究。

多核苷酸异构体的光谱性质,目前研究的尚少,通过光谱表现的特异性来鉴别多核苷酸的排列,是最简便的鉴别方法,这种方法将具有一定的发展前途。

此外,研究核酸的一级结构,对样品的纯度要有一定要求,目前制备分子均一的核酸尚存在相当困难,故在核酸的提取与纯化等方面均需要进一步改进。

参 考 文 献

- [1] 刘承斌,胡炳晨,梁植权,生物化学与生物物理学报, 2: 84, 1962。
- [2] 刘承斌,胡炳晨,吴肇,梁植权, *ibid.*, 2: 173, 1962。
- [3] 胡炳晨,刘承斌,吴肇,梁植权, *ibid.*, 3: 74, 1963。
- [4] 胡炳晨,刘承斌,吴肇,梁植权, *ibid.*, 4: 24, 1964。
- [5] 余微明,王德宝,生化学报, 1: 232, 1958。
- [6] Веспленко, С. К., Камзолова, С. Г. и Кнорре, Д. Г., Биохимия, 27: 142, 1962。
- [7] Andersen, A. W., Dakker, C. A. and Todd, A. R., J. Chem. Soc., 2721, 1952。
- [8] Beers, R. F., J. Biol. Chem., 235: 2393, 1960。
- [9] Bendich, A., Methods in Enzymology, Edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Vol. III, p. 715, 1967。
- [10] Brawerman, G., Biochim, Biophys. Acta., 61: 340, 1962。
- [11] Brown, D. M., Magrath, D. I. and Todd, A. R., J. Chem. Soc., 2708, 1952。
- [12] Brown, D. M., Dekker, C. A. and Todd, A. R., *ibid.*, 2715, 1952。
- [13] Brown, D. M., Fried, M. and Todd, A. R., *ibid.*, 2206, 1955。
- [14] Burrow, S., Crylls, F. S. M. and Narrison, J. S., Nature, 170: 800, 1952。
- [15] Burton, K. and Petersen, G. B., Biochem. J., 75: 17, 1960。
- [16] Butler, G. C., Methods in Enzymology, Edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Vol. II, p. 561, 1955。
- [17] Carpenter, D. C., Anal. Chem., 24: 1203, 1952。
- [18] Carter, C. E., J. Am. Chem. Soc., 72: 1466, 1950。

- [19] Chargaff, E., Lipshitz, C., Green, C. and Hodes, M. E., *J. Biol. Chem.*, **192**: 223, 1951.
- [20] Cohn, W. E., *Science*, **109**: 377, 1949.
- [21] Cohn, W. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**: 1471, 1950.
- [22] Cohn, W. E., *ibid.*, **72**: 2811, 1950.
- [23] Cohn, W. E., *J. Cell Comp. Physiol.*, **38** (Suppl. 1): 21, 1951.
- [24] Cohn, W. E., in the *Nucleic Acids Vol. 1*, 211~242 Acad Press, New York, 1955.
- [25] Cohn, W. E., *J. Biol. Chem.*, **235**: 1488, 1960.
- [26] Cohn, W. E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **48**: 583, 1961.
- [27] Cantoni, G. L., Gelboin, H. V., Luborsky, S. W. Richards, H. H., and Singer, M. F., *ibid.*, **61**: 354, 1962.
- [28] Crestfield, A. M. and Allen, F. W., *Anal. Chem.*, **27**: 424, 1955.
- [29] Davey, C. L., *Biochim. Biophys. Acta.*, **61**: 538, 1962.
- [30] Davidson, J. N. and Smellie, R. M. S., *Biochem. J.*, **52**: 594, 1952.
- [31] Day, E. D. and Mosher, W. A., *J. Biol. Chem.*, **197**: 227, 1952.
- [32] Dlugojczyk, A. and Allen, F. W., *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**: 215, 1961.
- [33] Dulbecco, R. and Smith, J. D., *ibid.*, **39**: 358, 1960.
- [34] Dunn, D. B., Smith, J. D. and Spahr, P. F., *J. Mol. Biol.*, **2**: 113, 1960.
- [35] Durand, M. C. and Thomas, R., *Biochim. Biophys. Acta.*, **12**: 416, 1953.
- [36] Edström, J. E., *J. Biophysic and Biochem. Cytol.*, **8**: 39, 1960.
- [37] Emanuel, C. F. and Chaikoff, I. L., *Biochim. Biophys. Acta.*, **28**: 550, 1958.
- [38] Fredericq, E., Oth, A. and Fontaine, F., *J. Mol. Biol.*, **3**: 11, 1961.
- [39] Fresco, J. R. and Warner, R. C., *J. Biol. Chem.*, **215**: 751, 1955.
- [40] Hayes, D. H., *J. Chem. Soc.*, 1184, 1960.
- [41] Heppel, L. A. and Whitfeld, P. R., *Biochem. J.*, **60**: 1, 1955.
- [42] Heppel, L. A., Whitfeld, P. R. and Markham, R., *ibid.*, **60**: 8, 1955.
- [43] Heppel, L. A. and Hilmoe, R. J., *Methods in Enzymology*, Edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Vol. II. 565, 1955.
- [44] Heppel, L. A. and Hilmoe, R. J., *Methods in Enzymology*, Edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Vol. II, 546, 1955.
- [45] Heppel, L. A., Ortiz, P. J. and Ochoa, S., *J. Biol. Chem.*, **229**: 679, 1957.
- [46] Herbert, E. and Canellakis, E. S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **42**: 363, 1960.
- [47] Herbert, E. and Wilson, C. W., *ibid.*, **61**: 762, 1962.
- [48] Hershey, A. D., Dixon, J. and Chase, M., J., *Gen. Physiol.*, **36**: 777,

1953.

- [49] Hotchkiss, R. D., *J. Biol. Chem.*, **175**: 315, 1948.
- [50] Jones, A. S. and Letham, D. S., *J. Chem. Soc.*, 2573, 1956.
- [51] Jones, A. S., Letham, D. S. and Stacey, M., *ibid.*, 2579, 1956.
- [52] Jones, A. S., Letham, D. S. and Stacey, M., *ibid.*, 2584, 1956.
- [53] Kaplan, H. S. and Heppel, L. A., *J. Biol. Chem.*, **222**: 907, 1956.
- [54] Kent, P. W., Lucy, J. A. and Ward, P. F. V., *Biochem. J.*, **61**: 529, 1955.
- [55] Kerr, S. E., Seraidarian, K. and Wargon, M., *J. Biol. Chem.*, **181**: 761, 1949.
- [56] Khorana, H. G., Tener, G. M., Bazzell, W. E. and Markham R., *Federation Proc.*, **17**: 253, 1958.
- [57] Khorana, H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**: 4657, 1959.
- [58] Khorana, H. G., *J. Cell Comp. Physiol.*, **54** (Supp. 1): 13, 1959.
- [59] Khorana, H. G. and Vizsolyi, J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**: 675, 1961.
- [60] Lane, B. G. and Butler, G. C., *Can. Biochem. Physiol.*, **37**: 1329, 1959.
- [61] Lane, B. G. and Butler, G. C., *Biochim. Biophys. Acta.*, **33**: 281, 1959.
- [62] Lipshitz, R. and Chargaff, E., *ibid.*, **42**: 544, 1960.
- [63] Löfgren, N., *Acta. Chem. Scand.* **6**: 1030, 1952.
- [64] Loring, H. S., Hammell, M. L., Levyl, W. and Bortner H. W., *J. Biol. Chem.*, **196**: 821, 1952.
- [65] Loring, H. S., *ibid.*, **197**: 809, 1952.
- [66] MacNutt, W. S., *Biochem. J.*, **50**: 384, 1952.
- [67] Magasanik, B., Vischer, E., Doniger, R., Elson, D. and Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **186**: 37, 1950.
- [68] Maver, M. E. and Greco, A. E., *J. Nat. Cancer Inst.*, **17**: 503, 1956.
- [69] Markham, R. and Smith, J. D., *Nature*, **163**: 250, 1949.
- [70] Markham, R. and Smith, J. D., *Biochem. J.*, **45**: 294, 1949.
- [71] Markham, R. and Smith, J. D., *ibid.*, **49**: 401, 1951.
- [72] Markham, R. and Smith, J. D., *Nature*, **168**: 406, 1951.
- [73] Markham, R. *Biochem. J.*, **52**: 552, 1952.
- [74] Markham, R. and Smith, J. D., *ibid.*, **52**: 558, 1952.
- [75] Markham, R. and Smith, J. D., **52**: 565, 1952.
- [76] Markham, R. *Brit. Med. Bull.*, **10**: 214, 1954.
- [77] Marshak, A. and Vogel, H. J., *J. Biol. Chem.*, **189**: 597, 1951.
- [78] McCully, K. S. and Cantoni, G. L., *J. Mol. Biol.*, **5**: 80, 1962.
- [79] Merrifield, R. B. and Woolley, D. W., *J. Biol. Chem.*, **197**: 521, 1952.
- [80] Moscarell, M. A., Lane, B. G. and Hanes, C. S., *Can. Biochem. Physiol.*, **39**: 1755, 1961.

- [81] Mrozek, S. L. and Allen, F. W., *Federation Proc.*, **20**: 365, 1961.
- [82] Petersen, G. B., *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**: 212, 1961.
- [83] Peterson, E. A. and Sober, H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 750, 1956.
- [84] Pratt, A. W., Toal, J. N. and Sober, H. A., *Federation Proc.*, **21**: 376, 1962.
- [85] Reid, J. C. and Pratt, A. W., *Biochem. Biophys. Research Communications* **3**: 337, 1960.
- [86] Rushizky, G. W. and Knight, C. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**: 945, 1960.
- [87] Rushizky, G. W. and Knight, C. A., *Virology* **11**: 236, 1960.
- [88] Rushizky, G. W. and Sober, H. A., *J. Biol. Chem.*, **237**: 834, 1962.
- [89] Rushizky, G. W., Sober, H. A. and Knight, C. A., *Biochim. Biophys. Acta.*, **61**: 56, 1962.
- [90] Rushizky, G. W., *Federation Proc.*, **21**: 371, 1962.
- [91] Schmidt, G., *Methods in Enzymology*, Edited by Colowick S. P. and Kaplan, N. O., Vol. II, 523, 1955.
- [92] Schuster, H., *J. Mol. Biol.*, **3**: 447, 1961.
- [93] Shapiro, H. S. and Chargaff, E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **39**: 62, 1960.
- [94] Shuster, L. and Kaplan, N. O., *Methods in Enzymology*, Edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Vol. II, 551, 1955.
- [95] Singer, M. F., Hilmo, R. J. and Heppel, L. A., *Federation Proc.*, **17**: 312, 1958.
- [96] Singer, M. F. and Cantoni, G. L., *Biochim. Biophys. Acta.*, **39**: 182, 1960.
- [97] Singer, M. F., Heppel, L. A. and Hilmo, R. J., *J. Biol. Chem.*, **235**: 738, 1960.
- [98] Smillis, R. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**: 557, 1959.
- [99] Smith, J. D. and Markham, R., *Biochem. J.*, **46**: 509, 1950.
- [100] Smith, K. C. and Allen, F. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**: 2131, 1953.
- [101] Soodak, M., Pircio, A. and Cerecedo, L. R., *J. Biol. Chem.*, **181**: 713, 1949.
- [102] Spencer, J. H. and Chargaff, E., *Federation Proc.*, **20**: 353, 1961.
- [103] Spencer, J. H. and Chargaff, E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**: 209, 1961.
- [104] Staehelin, M., Peterson, E. A. and Sober, H. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**: 289, 1959.
- [105] Staehelin, M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **49**: 11, 1961.
- [106] Staehelin, M., *ibid.*, **49**: 20, 1961.

- [107] Suzuki, T. and Ito, E., *J. Biochem.*, **45**: 403, 1958.
- [108] Tamm, C., Hodes, M. E. and Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **195**: 49, 1952.
- [109] Tamm, C., Shapiro, H. S. and Chargaff, E., *ibid.*, **199**: 313, 1952.
- [110] Tamm, C., Shapiro, H. S., Lipshitz, R. and Chargaff, E., *ibid.*, **203**: 673, 1953.
- [111] Tener, G. M., Khorana, H. G., Markham, R. and Pol, E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**: 6223, 1958.
- [112] Tuckerman, M. M., *Anal. Chem.*, **30**: 231, 1958.
- [113] Udenfriend, S. and Zaltzman, P., *Anal. Biochem.*, **3**: 49, 1962.
- [114] Veder, H. A. and Pascha, C. N., *Biochim. Biophys. Acta.*, **47**: 408, 1961.
- [115] Verwoerd, D. W., Kohlhage, H. and Zillig, W., *Nature*, **192**: 1038, 1961.
- [116] Vischer, E. and Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **176**: 703, 1948.
- [117] Volkin, E., *Methods in Enzymology*, Edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Vol. II, 539, 1955.
- [118] Wang, T. P., *J. Bact* **68**: 128, 1954.
- [119] Whitfield, P. R., *Biochem. J.*, **58**: 390, 1954.
- [120] Whitfield, P. R., *J. Biol Chem.*, **237**: 2865, 1962.
- [121] Wood, T., *Nature*, **176**: 175, 1955.
- [122] Wyatt, G. R., *Biochem. J.*, **48**: 584, 1951.
- [123] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S., *Nature*, **170**: 1072, 1952.
- [124] Wyatt, G. R., in the *Nucleic Acids Vol. I*, 243~256, Acad Press New York, 1955.
- [125] Young, R. T., Ralph, R. K., Gilham, P. T. and Khorana, H. G., *Federation Proc.*, **21**: 373, 1962.
- [126] Yu, Chuan-Tao and Zamecnik, P. C., *Biochim. Biophys Acta* **45**: 148, 1960.
- [127] Zytko, J., DeLamirande, G., Allard, C. and Cantero, A., *ibid.*, **27**: 495, 1958.
- [128] Boser, H., *Z. Physiol. Chem.*, **298**: 145, 1954.
- [129] Gerlach, E. and Doring, H. J., *Naturwissenschaften* **42**: 344, 1955.
- [130] Schuster, Heinz, *Z. Naturforsch.*, 15 b (5) 298, 1960.
- [131] Venner, H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **322**: 122, 1960.
- [132] Lavallo Robere, C. R., *Acad Sci.*, **250** (6): 1134, 1960.
- [133] Boulanger, P. and Montreuil, J., *Bull Soc. Chim. Biol.*, **33**: 784, 1951.

第二讲 核糖核酸酶解作用的新进展

郭 兆 同

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、引 言

降解核糖核酸的酶按作用方式可分为三大类:

(一) **核糖核酸酶** 这类酶作用于核酸的内磷酸双酯键。对不同碱基有选择性,如以嘌呤单核苷酸,或嘧啶单核苷酸为主要产物。磷酸键在核糖上的位置都是第3碳原子上(以下简称为3'-酯,其他位置以相应的数字表示),或2',3'-环状磷酸,以及2'-酯等。产物中除单核苷酸外,还有大小不同的片段(寡核苷酸)。

(二) **磷酸双酯酶** 这类酶作用于核酸内磷酸键,或从最末端开始逐个切断核苷酸间磷酸双酯键。产物都是单核苷酸,磷酸键的位为5'-或3'-脂。

(三) **磷酸单酯酶** 这类酶专门切断核苷-3'-磷及核苷-2'-磷或较大片段核酸的末端3'-磷酸键。

二、核 糖 核 酸 酶

(一) **牛胰核糖核酸酶**(简称为牛胰 RNase) 1940年 Kunitz^[22]自牛胰首先用硫酸铵分段沉淀法提出 RNase 的晶体。按纯化学观点,此酶毫无问题是单一纯品。1953年 Hirs 等^[20]用离子交换剂 Amberlite IRC-50×E-64 将 RNase 结晶分成 A, B 两个部分, A 占绝大部分,如图1。此后人们利用各种离子交换剂、电泳等新技术分离提纯 RNase。1959年有人利用 CM-纤维素树

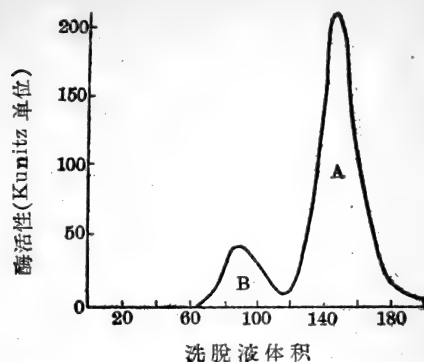


图1 RNase 在 IRC-50 柱中的层谱^[20]

脂^[3]来分离结晶 RNase, 得出 4 个有活性部分。不久又有人用 CM-树脂将 RNase^[41]分离后, 得 5 个部分, 但第 1 部分无活性。他们的工作只限于将 RNase 分成 4 个或 5 个部分, 表示 RNase 蛋白的非均一性, 并未深入到 RNase 的非均一性与降解核糖核酸特异性的关系中去。

1957 年 Hakim^[14]按 Hirs 等法先用 IRC-50 将几种不同来源的商品 RNase 结晶分出 A, B 两部分, 从中分析 A, B 各部

表1 4种 RNase 中 A 及 B 对释放单核苷酸的现象^[14]

来 源	腺	鸟	胞	尿
	克分子/100克分子			
阿摩厂出品原酶	—	1.2	15.7	18.1
A	—	1.0	16.7	18.6
B	—	13.8	12.2	13.0
握尔新顿厂出品原酶	—	0.9	16.0	17.9
A	—	0.8	16.8	18.2
B	—	9.8	9.2	13.1
纽特立兴厂出品原酶	—	1.0	16.9	18.5
A	—	0.7	16.2	18.1
B	—	10.5	9.2	10.2
拉波拉拖锐厂出品原酶	—	1.0	17.1	18.2
A	—	0.9	17.5	18.8
B	—	13.3	13.0	13.6

分在降解核酸的过程中所得产物,比較后得到一个初步結論,他认为 RNase A 的降解产物中以胞核苷酸、尿核苷酸最多,鳥核苷酸极少,而 RNase B 的降解产物中以鳥核苷酸比 RNase A 的多10倍,如表1。

有了这条綫索后, Hakim 继续用磁性电泳法将 RNase A 及 B 又分为 RNase A₁, A₂, B₁, B₂ 4 个活性部分^[15,16]。在不同来源的 RNase 中它們所占的比例不同。从所降解的核酸产物来看,有較显著的现象如: RNase A₁ 及 A₂ 释放嘧啶单核苷酸多些,对嘧啶的环状磷酸鍵有高活性。RNase B₁ 及 B₂ 释放嘌呤核苷酸多些,对嘌呤环状磷酸鍵有高活性,如表2。

表2 RNase A₁ A₂ B₁ B₂ 降解核酸时释放单核苷酸的现象^[15]

RNase	尿苷酸	胞苷酸 (克分子/100克分子)	腺苷酸	鳥苷酸
A ₁	17.4	17.3	0.8	0.8
A ₂	17.5	18.9	1.1	0.4
B ₁	13.5	14.8	6.5	1.5
B ₂	13.4	12.3	6.8	8.2

Staehelin^[38]用 RNase 降解酵母核糖核酸后,用 DEAE-纖維素树脂分离产物,得到以嘧啶单核苷酸及以嘧啶为末端的片段等,如表3。

表3 RNase 降解酵母核酸后产物的分布^[38]

单核苷酸	二核苷酸	三核苷酸		其 他
Cp	ApCp	ApApCp	ApGpCp	ApApApCp
Up	ApUp	ApApUp	ApGpUp	
	GpCp	GpApCp	GpGpCp	
	GpUp	GpApUp	GpGpUp	

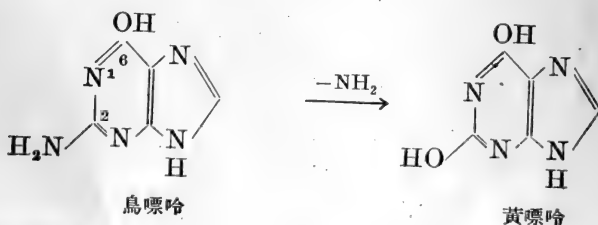
从表3看来,对于初步观察核酸分子中核苷酸順序情况已具备有利的条件。作者已用这个方法在TMV-RNA的降解方面。所得結果留在关于酶解 TMV-RNA 的进展部分再談。

关于 RNase A 及 B 的特异性还有一些报导,如发现核糖核酸中嘧啶组分含量减少,酶解速度就变小^[42]。奇怪的是牛胰 RNase 对于无嘧啶核糖核酸却仍照样降解。作者推测 RNase 中除 A 及 B 外,可能含有一种非特异的双脂酶。因为商品 RNase 可降解,无嘧啶酸,而 A 或 B 及 A + B 都不降解它。

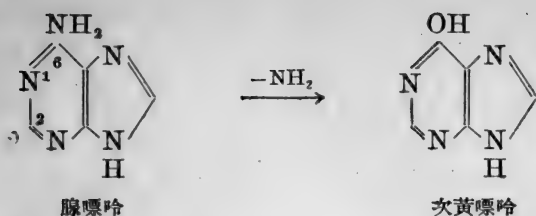
(二) 核糖核酸酶 T_1 及 T_2 核糖核酸酶的来源不限于牛胰,关于曲霉菌制剂中所纯化的核糖核酸酶(通常称为 RNase T_1 及 T_2),已进行了较深入的研究。

Sato 与 Egami^[33]自曲霉菌制剂中提取核糖核酸酶后,又从其中分离出耐热的部分。一是 T_1 为主要成分,一是 T_2 含量很少,每 100 克制剂只能提出 1 毫克 T_2 。两种酶的适宜 pH: T_1 在 pH 7.5, T_2 在 pH 4.5,各有显著不同的特异性。如 T_1 降解核糖核酸后,产物为鸟苷-3'-磷酸(G-3'-p)或以鸟核苷酸为末端的片段。其降解方式是先从核酸断链变成该核苷酸的环状磷酸酯的衍生物,再形成单核苷酸或片段(如图 2)。尤其令人感兴趣的是:对牛胰 RNase 所不能降解的核糖核酸“心”(RNA “core”)部分奏效。这个部分含鸟核苷酸最多^[34]。RNase T_1 的其他性质与牛胰 RNase 相近,也能被乙二胺四醋酸(EDTA)活化,被镁、钙等离子所抑制。

RNase T_1 能水解核糖核酸中的鸟苷酸与其他核苷酸间的磷酸双酯键成 G-3'-p, 也能将 H-2', 3'-p 及 X-2', 3'-p 水解成 H-3'-p, X-3'-p*, 但不能水解 A-2', 3'-p。可能因为在嘌呤环上第 6 位置上是羟基或酮基时, T_1 才能作用如下:



* X代表黄嘌呤, H代表次黄嘌呤。



能降解脱氨的 RNA 可以证明上述这一特异性^[85]如图 2:

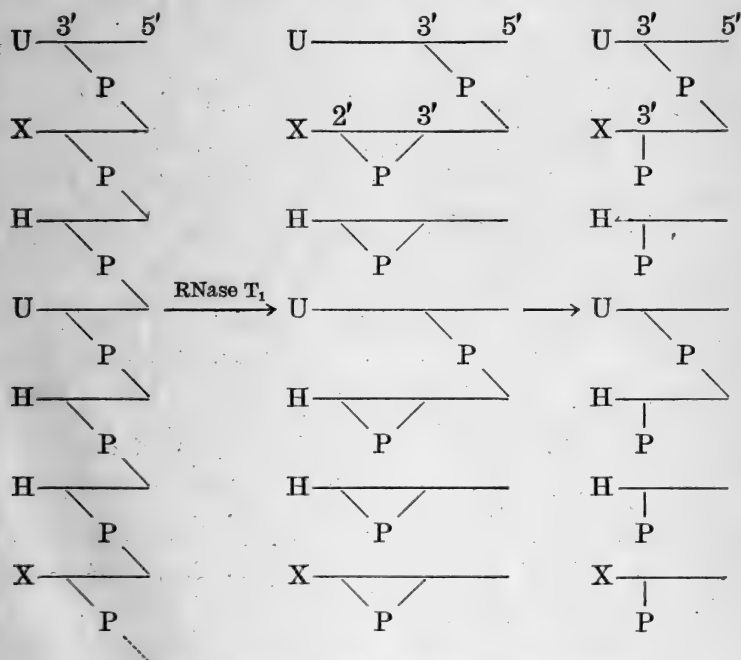
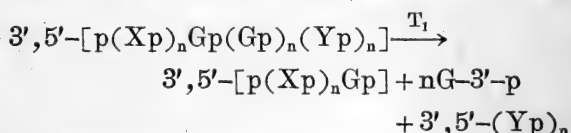


图 2 RNase T₁ 对脱氨后的 RNA 降解方式

RNase T₁ 及 T₂ 对无嘧啶核糖核酸的作用也不同, T₁ 对核糖核酸及无嘧啶核糖核酸的降解速度相同, 而 T₂ 降解前者较后者快^[43]。T₂ 降解核糖核酸后的产物以腺苷酸为末端的片段最多, 但没有腺嘌呤单核苷酸。所以推测纯化的 T₂ 是专门切断核糖核酸内部腺苷酸和其他核苷酸间的磷酸键^[94]。虽然如此, T₂ 对腺苷酸的特异作用, 还需再进一步在无嘌呤酸上证明。从最近的资料看来,

RNase T_1 及 T_2 对于研究核糖核酸的化学结构是很有用的。例如 RNase T_1 的特异性在于能切断鸟核苷酸与其他核苷酸间的磷酸键，或形成以鸟核苷酸为末端的片段。有人利用它来降解兔肝 s-RNA^[23]，因 s-RNA 的碱基中以鸟嘌呤及甲基鸟嘌呤较多。RNase T_1 能将全部鸟核苷酸的磷酸键切断，但对甲基衍生物的磷酸键不能切断。同时这也证明 T_1 确只能降解 6-羟基或酮基嘌呤的核苷酸，而第 1, 2 位置上还不能有其他基团取代，如 6-OH-2 二甲氨基嘌呤及 1-甲基鸟嘌呤等都不能被 T_1 所降解。

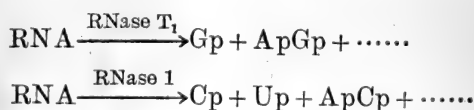
用 RNase T_1 降解 s-RNA 后初步结果可得出下面的规律：



只有在 2 个以上的鸟核苷酸连接在一起时，才能被 T_1 降解下成鸟核苷酸，否则少于 2 个时，只能形成以鸟核苷酸为末端的片段。

最近 RNase T_1 被利用测定酵母中 s-RNA 的末端 5 个核苷酸的顺序^[30]。先使较纯的 s-RNA 和 C^{14} -氨基酸相结合，然后被 RNase T_1 降解，经右旋糖酐凝胶 (Sephadex G-50) 及 DEAE 柱分离，将带放射性最强的核苷酸片段分出加以鉴定，推测为…… $[Gp]^* ApCpCpA$ 。从而不仅解决了第 4 个末端核苷酸是否 Ap 的疑问，更确定第 5 末端为 Gp。利用过碘酸测定末端核苷酸时，对于 s-RNA 的第三末端尚很难确定^[48]。RNase T_1 在解决 s-RNA 的结构方面具备了优越性。

RNase T_1 及牛胰 RNase 既有不同特点，有人就想到将这两种酶降解一种核酸。Reddi^[31] 用两者各降解同一 TMV-RNA 后，产物如下：



* $[Gp]$ 是根据 RNase T_1 的规律性而作的推论。

三浦^[1]更进一步将两者先单独降解核酸，又合用两者降解同一物如图 3：

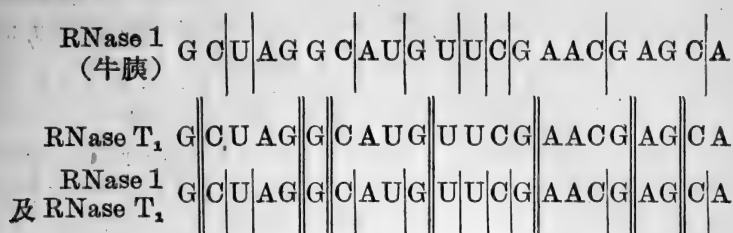


图 3 RNase T₁及 RNase 1 对 RNA 切断方式^[11]

由上面结果看来，两种酶合用后，可以帮助了解核苷酸排列顺序。例 AGGC 中是 GAGC 还是 GGAC，用 RNase T₁ 就可以知道是 AGGC，否则在合用时不能同时产生鸟苷酸和胞苷酸。又如 GCU 的排列不是 GUC 由 RNase 1 作用，知 GC|U|……由 RNase T₁ 作用，知 G|CUAG|……在合用时又为 G|C|U|AG|……而确定。如果我们将 AGGC|GC|U|AU| 换成 GC|U|AGGC|AU|，RNase 1 切断方式仍相同，但 RNase T₁ 切断方式已不同，产物就变成 AG|G|CG|CUAU……，不是原来的 G|CUAG|G|CAUG|……了。因此对了解核苷酸的顺序是有帮助的。

(三) 其他来源的核酸酶 自从 Cuningham^[6] 于葡萄球菌培养液中发现核酸酶以来，在提纯方面及从不同菌株中寻找核酸酶有一些工作。

Reddi^[30] 发现金黄色化脓小球菌变种的核酸酶降解 TMV-RNA 时，产物的规律为：(1) 大部分是嘌呤或嘧啶-3'-核苷酸，(2) 其余是二核苷酸，(3) 对嘌呤或嘧啶环状磷酸不起作用。

Hilmore 等自一种固氮菌中分离出一种核酸酶^[39,40]，对核糖核酸及脱氧核糖核酸都可降解。经过硫酸铵两次沉淀及柱层析等步骤后可提高活性 30 余倍，比活性达 1000 单位，降解腺苷酸高聚物(Poly A)时产物中没有单核苷酸或核苷存在。说明此酶具有切断内部磷酸键的特点。产物以二，三核苷酸片段最多。由蛇毒双酯酶降解其产物，全部为 5'-单核苷酸，不含有核苷及核苷二磷酸。

証明这些片段都是以5'-磷酸为末端的。从制备或生产5'-单核苷酸的角度来看,此酶是有经济价值的。更有兴趣的是此酶对尿苷酸高聚物作用很慢,对胞苷酸高聚物作用更慢,对鳥苷酸高聚物几无作用。对腺苷酸高聚物作用是最快的,如表4。

表4 酶解核苷酸高聚物的速度比較^[40]

高 聚 物	反 应 液 酶 浓 度 (酶单位)	經 NaOH 水解后的核苷量 (μ M)
腺	0.43	0.052
尿	4.3	0.040
胞	12.9	0.006
鳥	12.9	很难发现

从上面結果看来,此酶对腺苷酸的磷酸鍵有特异性。可惜沒有用核糖核酸的降解产物来証明。如果此酶真具有对腺嘌呤作用的特点,又是专门从内部切断磷酸鍵,那末对于核糖核酸結構問題又会大大推进一步。

从紅霉素鏈霉菌的菌絲体中也曾提純 RNase^[44],其性质与曲霉制剂中 RNase T₁ 相近,专门切断鳥苷酸的5'-磷酸鍵。对核糖核酸“心”也能作用,不过它不能完全降解,不能切断的部分仍是以鳥便嘌呤为末端的多核苷酸。此酶耐热性很强,pH 5.6 时 80°C 5 分钟不失活性,100°C 10 分钟失去活性仅 10%。

从微生物中寻找新的特异酶是很有发展的,1959 年以前的文献中除曲霉菌 RNase T₁ 外,尚看不出微生物的核酸酶重要性。1960 年以来这方面发展很快。从微生物中寻找新的工具酶的潜力很大,方法及来源都比从动植物組織中提取要簡易得多。

还有人自大肠杆菌核朊微粒中提出核酸酶^[37]对 6-氨基核苷酸(腺嘌呤及胞嘧啶的核苷酸)降解速度要比对 6-酮基核苷酸(鳥便嘌呤及尿嘧啶的核苷酸)快 5 倍,因此在降解初期,腺嘌呤、胞嘧啶多于鳥便嘌呤和尿嘧啶。

菠菜中也曾被提出核酸酶^[45]专门降解单核苷酸的环状磷酸鍵。

以上这些酶都是属碱性核酸酶,从鼠肝中找出一种核酸酶^[40],适宜的 pH 在 5.7 至 7.8。可将 A-2', 3'-p 打开,成为 A-2'-p,产物中没有 A-3'-p。

另外有人报告提取酶的方法不同,分离出的酶部分也不同^[10],例如用 0.25 N H₂SO₄ 提取牛胰中 RNase 时,在 IRC-50 层析图谱上表现出两个峰,如用磷酸缓冲液或蔗糖液等提取,可分出 3 个峰来。不论牛胰、鼠胰都得同样结果。不过直到现在还未看到进一步报告第 3 个部分的酶在作用方式上与其他两者有何不同。

(四) 核糖核酸酶对烟草花叶病毒核糖核酸降解 Reddi 用 RNase 1 对 TMV-RNA 降解时^[31]没有发现产物中有 GpCp,而 ApGpCp 含量较高。

Rushizky 等^[32]用 RNase 1 降解三种不同株 TMV-RNA 后,找出酸溶部分与酸不溶部分中核苷酸含量的百分率是相近的,三个菌株的差异表现在核苷酸顺序上,如表 5。

表 5 RNase 1 降解三种不同株 TMV-RNA 后产物分布^{[32]*}

核 苷 酸	TMV	M (微克/毫克 RNA)	HR
Up	125	125	123
Cp	81	80	78
GU	56	55	62
AU	53	51	47
AAU	27	26	17
AGU	21	21	15
GGU	14	13	20
AAC	12	12	17
(A ₂ G)U	17	18	23
(AG ₂)U	12	12	7.2
(AG ₂)C	14	15	10

* 仅摘录原文献中有显著差异的数据。

Staehelin^[38] 也用 RNase 1 降解 TMV-RNA 所得结果与 Reddi 的稍有不同,与 Rushizky 等的结果相同,即 Reddi 未发

现的 GpCp 作者已找到, ApGpCp 含量不象 Reddi 的结果中那样高, 如表 6。

表 6 RNase 1 降解 TMV 及 TYMV* 核酸后
产物分布表^[38]

核 苷 酸	TMV (占总核苷酸百分数)	TYMV
Cp	8.05	22.8
Up	12.8	13.2
ApCp	4.6	10.2
GpCp	4.1	8.0
⋮	⋮	⋮
GpApCp	1.72	2.7
ApGpCp	1.72	2.7
⋮	⋮	⋮

* 萝卜黄斑病毒缩写。

注: 此表只采用了原表部分数据。

此外降解条件不同, 影响了产物的分布。如在 pH 7.0 磷酸缓冲液中 18 小时与在 pH 8.6 三甲基氨基甲烷缓冲液中 75 分钟, 产物中腺苷酸和鸟苷酸就有很大的改变, 如表 7。

表 7 不同条件下对酶解产物分布的影响^[38]

核 苷 酸	实验 1	实验 2 (占总核苷酸%)	实验 3
Cp	11.1	8.3	8.5
Up	17.2	12.8	12.6
Ap	2.1	—	—
Gp	6.3	3.5	—

实验 1, pH 7.0, 0.1 M 磷酸缓冲液, 18 小时, 37°。

实验 2, pH 8.6, 0.1 M 三甲基氨基甲烷缓冲液, 75 分钟, 37°。

实验 3, pH 7.7, 无盐系统。

注: 此表只采用了原表部分数据。

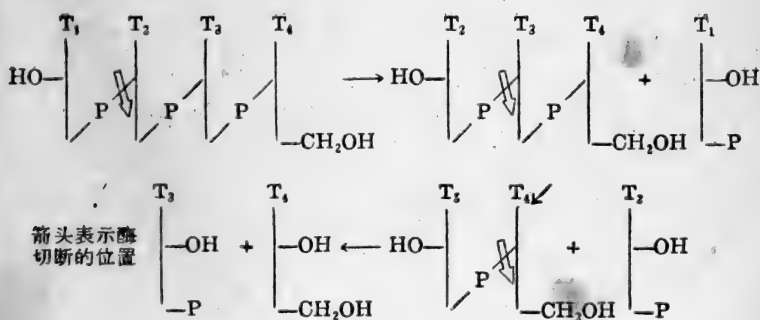
三、磷酸双酯酶

(一) 蛇毒磷酸双酯酶 蛇毒双酯酶的純化問題主要是如何与 5'-核苷酸酶的分離。自从 Cohn 和 Volkin 发现此酶有将 RNA 降解成 5'-单核苷酸的能力^[5]，并証明只能降解腺苷-5'-磷酸苯，对 3'-磷酸酯沒有作用以来，还是有人认为它能降解核苷-2', 3'-环状磷酸酯，很慢地变成核苷-3'-磷酸。

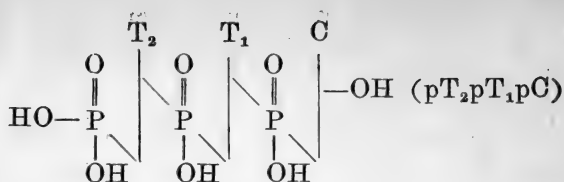
对于多核苷酸，如腺苷酸的或胸腺嘧啶多核苷酸作用后，都得核苷-5'-磷酸或脫氧核苷-5'-磷酸^[18]。寡核苷酸无末端 5'-磷酸者也能被此酶降解^[8, 46]，但速度較慢。最近 Razzell 等証明，蛇毒双酯酶水解 TpTpT 的速度只有 pTpTpT 的 1/20^[27, 28]。

一般认为含 3'-磷酸为末端的多核苷酸不能为蛇毒双酯酶所降解^[5]，但这种抗性不是絕对的，如果将双酯酶浓度提高 1000 倍，降解依然能进行^[9]。

Razzell 等^[27]发现蛇毒双酯酶有如降解氨基酸間肽鏈的羧肽酶作用，可以逐个切断磷酸鍵而得 5'-单核苷酸，经过分析认为酶解如下面方式进行：



为了确証双酯酶的专一性，不会从 5'-磷末端的一端切断磷酸鍵，用 pTpTpC 来証实。如果最初产物是 T-5'-p 则表示酶无专一性，如果在产物中首先有 C-5'-p，则表示酶有专一性，結果如下：



R_f	(0.22)	(0.56)	(0.70)	(1.0)
2	0.08 μ M ○	<0.018 ○	0.02 ○	0.002 ○
5	0.06 μ M ○	0.027 ○	0.04 ○	0.022 ○
15 分钟	0.04 μ M ○	0.035 ○	0.05 ○	0.034 ○
	pTpTpC	pTpT	pC	pT

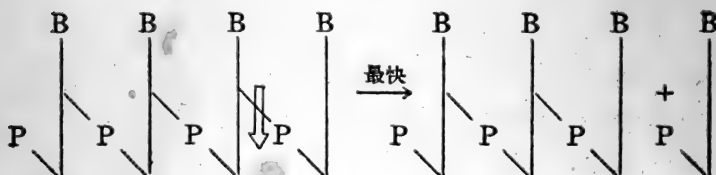
上述产物中没有发现 pTpC, 证明此酶确是自 3'-OH 处切断磷酸键, 而不在 5'-p 的一端。

Laskowski 等^[12,47]已将蛇毒双酯酶提纯到 234 倍, 除去了脱氧核糖核酸酶和 5'-核苷酸酶, 逐个切下 5'-单核苷酸, 而不形成其他如核苷等。不过他所用的是脱氧型的寡核苷酸, 至于能否应用在大分子核酸上还不知道。

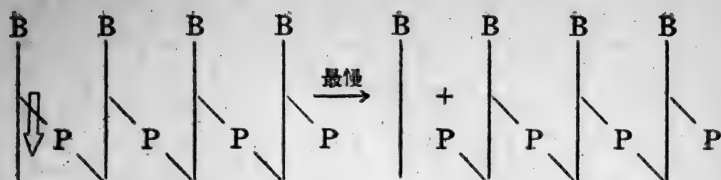
目前已知蛇毒双酯酶降解多核苷酸的规律如下^[2]:

1. 一端有磷, 则自对侧末端开始。

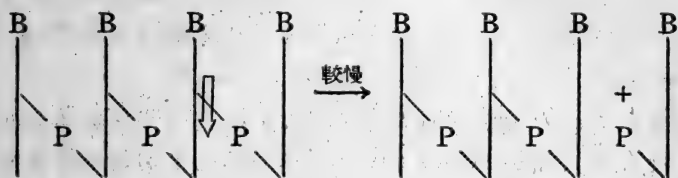
(1) 带 5'-磷酸者。



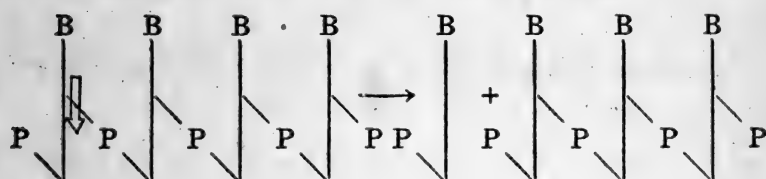
(2) 带 3'-磷酸者。



2. 两端无末端磷酸, 则自 3'-OH 的一端开始。



3. 两端都有末端磷酸, 自 5'-p 的一端开始。



关于 1 (1) 还有不同说法, 按 Razzell 的结果, 他认为没有降解带 3'-磷酸的可能^[27]。但有人认为增加酶浓度, 也能进行降解^[9]。

(二) 牛脾磷酸双酯酶 Hilmore 最初自牛脾提出了双酯酶^[17], 发现其降解方式与蛇毒双酯酶相反^[26]。RNA 经此酶作用后, 产物为 3'-单核苷酸, 但对于带 5'-末端磷的核糖多核苷酸是不作用的^[18]。近来也发现这种情况不是绝对的, 与蛇毒双酯酶一样, 增加酶浓度许多倍, 也可进行较慢的降解, 不论牛脾或蛇毒中分离出来的双酯酶, 对嘌呤或嘧啶碱基都无选择性。

近来 Razzell 等^[29]的实验证明牛脾双酯酶提纯 240 倍后, 对 5'-OH 的核苷酸片段表现出逐个切断磷键的作用, 如对 TpTpC 的降解见表 8。

表 8 牛脾双酯酶对 TpTpC 降解方式^[29]

时 间 (分钟)	TpTpC	TpC (267 M μ 光密度)	Tp	C	总 量
10	4.0	0.84	0.56	0	5.9
16	3.1	1.0	0.80	0.15	5.8
25	2.1	1.6	0.91	0.22	5.7

此酶对核糖核酸“心”完全降解,产生 3'-单核苷酸^[19]。降解过程不象其他核糖核酸酶先形成 2', 3'-环状磷酸键的中间产物。另外对 A-3', 5'-U 可作用,对 A-2', 5'-U 不作用。

蛇毒与牛脾的磷酸双酯酶近来颇受到注意,都在想法使此酶如何发挥外端核酸酶(exonuclease)部分的逐个切断磷酸键的作用。如果能找到较好的并且对大分子 RNA 末端有作用而不致影响 RNA 分子上其他部分的外端核酸酶,那末对于核酸结构的了解就会大大加快了。

现在将这两种酶在核苷酸片段上的作用方式综合示意如图 4:

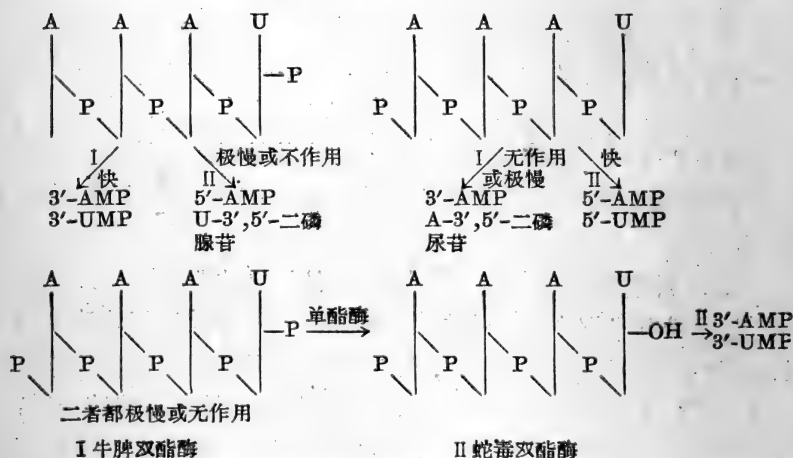


图 4 牛脾及蛇毒双酯酶作用方式示意图

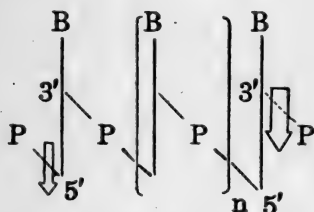
有了这两种酶,在鉴定工作上已经可以顺利地解决了片段上末端问题,如果掌握了它们的外端核酸酶部分,片段上的核苷酸顺序问题就可以准确地解决了。

四、磷酸单酯酶

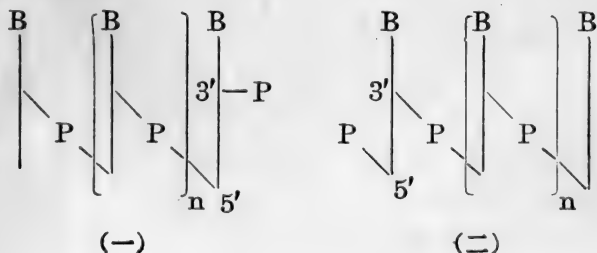
常用的磷酸单酯酶来源于肥大症的前列腺中，成人尸体的前列腺也可用。由于单酯酶的作用方式较简单，专一，近来的研究报导也就限于提纯方面，如简化提取操作、提高纯度等。难除去的杂质为磷酸双酯酶和核糖核酸酶。Frankel-Conrat 等^[13]曾用磷酸单酯酶研究 TMV-RNA 末端磷与感染性的关系时，不能肯定末端磷到底是在 3'-位置，还是在 5'-位置，只好推测可能性最大的还是在 3'-位置。作者认为可能单酯酶中杂有双酯酶，使整个 RNA 分子可能有了改变，因此感染性虽有了降低，这种降低还不能肯定究竟是因为失去了 3'-末端磷还是 RNA 分子中有了变化。

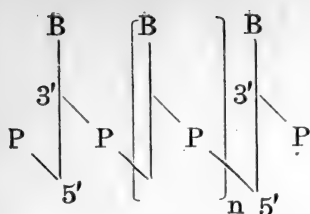
Ostrowski 等^[26]认为以前纯化单酶时^[4,7]，双酯酶尚存 0.05%，于是改进了提纯方法。不过没有提到究竟提高纯度多少倍。仅用电泳法等鉴定其为单一成分。

作者报告此酶对末端 2'或 3'-磷能很快地脱去，对 5'-末端磷则脱得慢，对磷酸双酯键则不作用，并对 RNA 不产生解聚现象，如下面示意图^[25]：

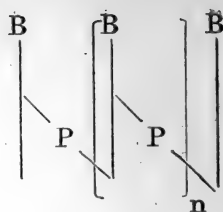


按 Frankel-Conrat 的看法^[13]，RNA 中的末端磷可能有六种形式：

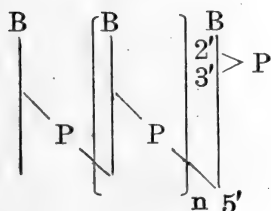




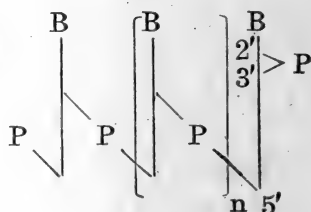
(三)



(四)



(五)



(六)

单酯酶将式(一)(二)(三)都能脱磷,现留下的问题是(五)(六),至今还未见有文献报导。

五、結 束 語

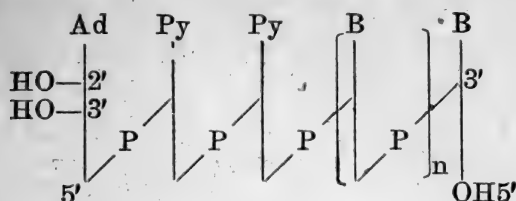
从上面所提到的酶来看,自生物体内寻找新的特异工具酶是很有希望的。从曲霉菌的 RNase T₁ 以及其他微生物中已发现的酶来看,在这方面寻找比在动物或植物组织中寻找可能更好些。

如采用化学方法与酶降解法相结合的办法,则收效可以更快。

六、补 充

最近 Sugiyama 等^[40a]用碱解法测定 TMV-RNA 的末端为腺苷,并认为另一端没有 5'-磷,因碱解后没有发现核苷-3', 5'-二磷酸的物质。Whitfield^[47a]用牛胰 RNase 降解该 RNA 也获得一致的结果,证明其一端为腺苷。另外作者又用 RNase T₁ 及枯草杆菌的 RNase 降解该 RNA,希望找出与腺苷相邻的第 2, 3 或 4 末端核苷酸的顺序。实验结果利用了反证法推测该 RNA 的第 2, 3 末端可能都是嘧啶核苷酸,但无法说明是胞苷酸抑或尿苷

酸。可以认为 TMV-RNA 的部分结构如下：



n 为 6500; Py 为嘧啶; B 为何何碱基。

Rushizky 等^[32a]比较了 TMV 的三种不同株的 RNA 被 RNase T_1 降解后,产物中发现 HR 株与对照株及 M 株有些不同,如 HR 株含 UpGp、CpGp 等的量较高,UpUpGp 的量则比另二株少,说明 HR 株的顺序与另两株有所不同。

s-RNA 方面,Herbert 等^[18a]用蛇毒双酯酶短促时间的接触降解后,发现所分离出的该 s-RNA 接受苏氨酸的能力还可因再加入 ATP,CTP,UTP 而完全恢复,但接受缬氨酸的能力在同样条件下不能完全恢复原状。这个现象可说明接受不同氨基酸的特异 s-RNA 的顺序可能是各不相同的。Nihei 等^[84]也用蛇毒双酯酶降解兔肝 s-RNA,在不同时间内观察产物分布,如 4.5 小时、16 小时及 22 小时内各降解 s-RNA 的 19.4%,53.3%及 98.8%,推算出 s-RNA 为 70 个核苷酸组成。除 4 种主要碱基外,还有少量的拟尿苷酸、甲基胞苷酸、甲基鸟苷酸、甲基腺苷酸以及两种未知单核苷酸。McCully 等^[23a]用 RNase T_1 降解兔肝 s-RNA,欲了解 Gp 与 Gp 之间常出现些何种顺序的片段。作者认为下列片段常出现于 s-RNA 结构中。

...pGp(Gp)_n...,...pGpApGp...,...pGpCpGp...

及...pGpCpCpGp...

三浦^[36a]曾用牛胰 RNase 降解酵母 s-RNA,经 Dowex 1X2 分离,产物为 Cp,Up,RUp*,ApCp,ApApCp,GpCp 等 6 个峰,

• RUp 拟尿苷酸。

由于 RNase 1 不能将 s-RNA 降解完全成小片段, 对 RNase 1 “心”也还缺乏分离方法, 尚不能将两种酶解产物并列比较, 互补不足, 推测 s-RNA 的顺序, 因此, 解决分离较大片段的技术可能是目前最迫切的任务。

参 考 文 献

- [1] 竹村彰祐, 三浦謹一郎: 蛋白质, 核酸, 酵素, 6: 458, 1961。
- [2] 鈴木友二, 岩永貞昭: 蛋白质, 核酸, 酵素, 6: 13, 1961。
- [3] Aqvist, E. G. and Anfinsen, C. B., J. Biol. Chem., 234: 1112, 1959.
- [4] Boman, H. G. Arkiv. Kemi., 12: 453, 1958.
- [5] Cohn, W. E. and Volkin, E. J. Biol. Chem., 203: 319, 1953.
- [6] Cuningham, L., Callin, B. W. and De Garilhe, M. P., J. Amer. Chem. Soc., 78: 4642, 1956.
- [7] Davison, H. M. and Fishman, W. H., J. Biol. Chem., 234: 526, 1959.
- [8] De Garilhe, M. P. and Laskowski, M., J. Biol. Chem., 223: 661, 1956.
- [9] De Garilhe, M. P., Cunningham, L., Laurila, U. and Laskowski, M., J. Biol. Chem., 224: 751, 1957.
- [10] Dickman, R., Morrill, G. A. and Trupin, K. M., J. Biol. Chem., 235: 169, 1960.
- [11] Dirksen, M. L. and Dekker, C. A., Trans. Faraday Soc., 55: 488, 1959.
- [12] Felix, F., Potter, J. L. and Laskowski, M., J. Biol. Chem., 235: 1150, 1960.
- [13] Gordon, M. P., Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H., J. Biol. Chem., 235: 1014, 1960.
- [14] Hakim, A. A., Enzymol., 18: 252, 1957.
- [15] Hakim, A. A., Enzymol., 20: 108, 1958.
- [16] Hakim, A. A., Enzymol., 22: 73, 1960.
- [17] Heppel, L. A. and Hilmore, R. J., Methods in Enzymol., Colowick and Kaplan ed., Vol. II, 565, 1955.
- [18] Heppel, L. A., Ortiz, P. J. and Ochoa, S., Science, 123: 415, 1956.
- [18a] Herbert, E. & Canellakis, E. S., Biochim Biophys. Acta, 47: 85, 1961.
- [19] Hilmore, R. J., J. Biol. Chem., 235: 2117, 1960.
- [20] Hirs, C. H. W., Moore, S. and Stein, W. H., J. Biol. Chem., 200: 493, 1953.
- [21] Kalnitsky, G., Hummel, J. P. and Dierks, C., J. Biol. Chem., 234: 1512, 1959.
- [22] Kunitz, M., J. Gen. Physiol., 24: 15, 1940,

- [23] McCully, K. S. and Cantoni, G. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 190, 1961.
- [23a] McCully, K. S. & Cantoni, G. L., *J. Mol. Biol.*, **5**: 80, 1962.
- [24] Naoi-Tada, M., Sato-Asano, K. and Egami, F., *J. Biochem.*, **48**: 757, 1959.
- [25] Ostrowski, W. and Tsugita, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**: 68, 1961.
- [26] Razzell, W. E. and Khorana, H. G., *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**: 1770, 1958.
- [27] Razzell, W. E. and Khorana, H. C., *J. Biol. Chem.*, **234**: 2105, 1959.
- [28] Razzell, W. E. and Khorana, H. G., *J. Biol. Chem.*, **234**: 2114, 1959.
- [29] Razzell, W. E. and Khorana, H. G., *J. Biol. Chem.*, **236**: 1144, 1961.
- [30] Reddi, K. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **36**: 132, 1959.
- [31] Reddi, K. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **44**: 378, 1960.
- [32] Rushizky, G. W. and Knight, C. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**: 945, 1960.
- [32a] Rushizky, G. W., Sober, H. A. & Knight, C. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 56, 1962.
- [33] Sato, K. and Egami, F., *J. Biochem.*, **44**: 753, 1957.
- [34] Sato-Asano, K., *J. Biochem.*, **46**: 31, 1959.
- [35] Sato-Asano, K. and Fujii, Y., *J. Biochem.*, **47**: 608, 1960.
- [36] Sato-Asano, K. and Egami, F., *J. Biochem.*, **50**: 467, 1961.
- [36a] Sato-Asano, K., *J. Biochem. (Japan)*, **50**: 544, 1961.
- [37] Spahr, P. F. and Hollingworth, B. R., *J. Biol. Chem.*, **236**: 823, 1961.
- [38] Staehelin, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **49**: 11, 1961.
- [39] Stevens, A. and Hilmore, R. J., *J. Biol. Chem.*, **235**: 3016, 1960.
- [40] Stevens, A. and Hilmore, R. J., *J. Biol. Chem.*, **235**: 3023, 1960.
- [40a] Sugiyama, T. & Fraenkel-Conrat, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**: 1393, 1961.
- [41] Taborsky, G., *J. Biol. Chem.*, **234**: 2652, 1959.
- [42] Takemura, S., Takagi, M., Miyazaki, M. and Egami, D., *J. Biol. Chem.*, **46**: 1149, 1959.
- [43] Takemura, S. and Miyazaki, M., *J. Biochem.*, **46**: 1281, 1959.
- [44] Tanaka, K., *J. Biochem.*, **51**: 62, 1961.
- [45] Tuve, T. W. and Anfinsen, C. B., *J. Biol. Chem.*, **235**: 3437, 1960.
- [46] Volkin, E. and Cohn, W. E., *J. Biol. Chem.*, **205**: 767, 1953.
- [47] Williams, E. J., Sung, Shau-Ching and Laskowski, M., *J. Biol. Chem.*, **236**: 1130, 1961.
- [47a] Whitfield, P. R., *J. Biol. Chem.*, **237**: 2865, 1962.

- [48] Yu Chuan-Tao and Zemecnik, P. C., *Biochim. Biophys. Acta*, 45: 148, 1960.
- [49] Zytko, J., De Lamirande, G., Allard, C. and Cantero, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 27: 495, 1958.

第三讲 核酸的结构

梁 植 权

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、引言

化学、细胞学以及遗传学的研究指出核酸是构成生物体的基本物质之一,它在控制生物体系的代谢、生殖及生长中占主要的地位。一般认为脱氧核糖核酸(以下简称 DNA)是遗传信息的携带者,而核糖核酸(以下简称 RNA)则在蛋白质的合成中起模板的作用。目前,除了高分子的 RNA 之外,还发现了分子较小的信息核糖核酸(m-RNA),以及分子更小的可溶性核糖核酸(s-RNA)。m-RNA 及 s-RNA 另有报告介绍,不在此重复。本报告只拟介绍 DNA 及高分子 RNA 的结构。

核酸是核苷酸的聚合体。它的单体——核苷酸,含有三种组成成分:碱基(嘌呤和嘧啶),戊糖(戊糖或脱氧戊糖)和磷酸。含有戊糖的核酸称为核糖核酸,而含脱氧戊糖的名为脱氧核糖核酸。这两类核酸都主要含有四种碱基,亦即主要为四种核苷酸所组成,其中有三种碱基是二者都有的,即腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C);有一种不同,即 DNA 含胸腺嘧啶(T),而 RNA 则含尿嘧啶(U)。此外,它们还可能含有一些其他碱基,但一般含量都很低。

一般认为 DNA 之所以能携带不同的遗传信息是由于它们具有不同的核苷酸排列顺序,不同的链长,以及一定的立体结构。同样, RNA 之所以能合成各式各样的蛋白质也是由于同样的原因。由此可见核酸的功能决定于它们的结构,所以结构的研究是有极

重要意义的。

核酸的结构可以从它的不同組織水平划分为一级结构、二级结构及三级结构。一级结构包含核苷酸的连接方式和排列顺序，以及核酸链为一连续长链或由许多短链所组成的问题。二级结构主要讨论螺旋结构问题。三级结构则讨论核酸的立体构型。

本报告不拟介绍核苷酸的排列顺序问题，关于这个问题另有报告介绍，因此，在这里主要是谈谈二级结构与三级结构的一些问题。

核酸结构的研究可以分为两类：一类是固体状态的观察，另一类是在溶液中，主要是在水溶液中的观察。固体状态的观察依靠X射线衍射和电子显微镜技术。在溶液中的观察利用了曾经用于蛋白质理化性质研究的各种方法，如超速离心、粘度、扩散、光散射、电泳等等。此外，又可以加入一些外加因素使核酸的结构发生改变和破坏(变性和降解)，通过这些结构的改变和破坏，也能对核酸的结构有所了解。

二、脱氧核糖核酸的结构

(一) 固体状态的观察

1. X射线衍射法的研究及 Watson-Crick 关于 DNA 结构的假说 1938 年 Astbury 及 Bell^[1] 研究了 DNA 钠盐纤维的 X 射线衍射图谱，发现顺着纤维的长轴有长度为 3.34 \AA 的重复间隔。他们将此解释为许多扁平的核苷酸上下叠在一起所引起，其扁平面与长轴垂直。他们^[2] 又观察到核酸的结构型式每 27 \AA 重复一次。如核苷酸都是平扁的而且上下积叠的话，则此距离相当于 8 个核苷酸。Astbury 并假定在核苷中，嘌呤或嘧啶环和糖环是在同一平面。

Furberg^[3,4] 根据 X 射线衍射的研究指出在胞核苷中嘧啶环与糖环不在同一平面，而是几乎成垂直方向，二环间的角度大致为 90° 。他对尿核苷、腺核苷及鸟便核苷的结构也曾加以研究，并证明它们极为相似。Furberg 的研究虽限于核糖核苷，但一般认为在

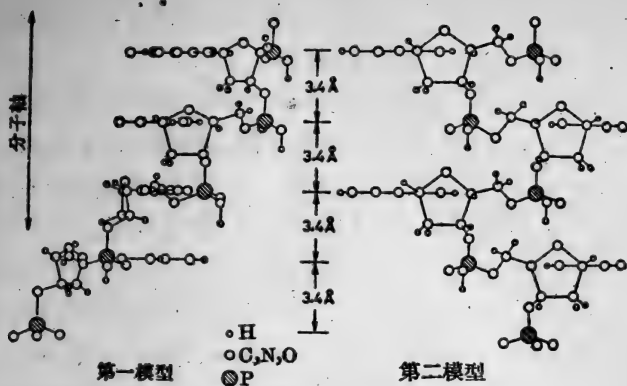


图1 Furberg 的两种结构模型

脱氧核糖核苷中,糖环的 $C_{2'}$ 羟基为氢所代替,不会引起结构上的显著改变。Furberg^[5] 根据他对核苷的研究提出核酸的两种可能结构形式(图1)。在他提出的结构中,嘌呤及嘧啶环和分子的长轴成直角,但糖环及 $P-O_{3'}$ 键则与长轴平行。两个相邻核苷酸的相当基团(如磷原子,嘌呤环,嘧啶环等)间的距离大约为 3.4 \AA 。

Pauling 及 Corey^[6,7] 于 1953 年提出另一核酸的结构模型。他们的模型是由三条互相盘绕的螺旋形多核苷酸链所构成,螺旋周数七周中有约 24 个核苷酸,螺旋方向为右手螺旋,磷酸基在中心,糖基围绕在它们外面,最外层为碱基,碱基环的平面大致和长轴垂直。他们认为此模型符合 X 射线衍射结果,并且也和核酸的许多化学性质一致。

但是 Pauling 及 Corey 的结构模型和某些试验结果不符合。Gulland 等^[8] 的电位滴定数据指出磷酸基可以滴定,而嘌呤及嘧啶的氨基及 $-NH-CO-$ 基则不能滴定,它们是被氢键连系起来的。染料及蛋白质吸附试验也指出磷酸基能和大离子结合。这些事实都说明磷酸基不在分子内部而是在分子外部。Watson 及 Crick^[9] 认为在此结构中许多 Van der Waals 距离过短。

继 Pauling 及 Corey 之后, Watson 及 Crick (1953)^[9-11] 提出了 DNA 的另一结构模型。他们所提出的模型看来和大量物

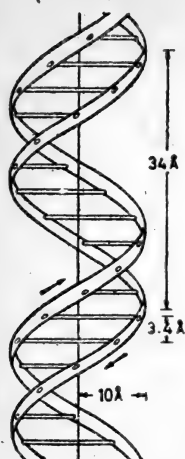


图2 Watson-Crick 提出的DNA鈉盐的螺旋結構

理及化学的实验数据相符合，因此目前为一般所接受(图2)。

Watson 及 Crick 的结构包含两条多核苷酸链围绕同一轴盘旋成一双螺旋体，且都是右手螺旋。每一多核苷酸链的构型和 Furberg 的第一模型一样，糖和嘌呤及嘧啶的相对位置也和 Furberg 提出的胞核苷的结构极相似。嘌呤和嘧啶在螺旋的内部，磷酸基在外部。顺长轴方向，每 3.4 \AA 有一个核苷酸，核苷酸间成 36° 角，因此每周有 10 个核苷酸，且每隔 34 \AA 重复出现同一结构。

两链依靠二者的嘌呤及嘧啶的氢键连系在一起。每链提供一个碱基，碱基的平面和分子的长轴垂直。互相配偶的碱基有一定的规律。这是由于下面的假定：糖-磷酸链所形成的螺旋的直径是 20 \AA ，由于螺旋的直径是固定的，为了在二链间形成均一键，则必需一条链上的嘌呤和另一链上的嘧啶相结合，如果两个嘌呤结合，则链间的距离将过短，不能容纳。如果两个嘧啶配合，则链间的距离过长，不能形成键。从碱基的异构的最可能存在形式考虑，唯一可能的配偶是腺嘌呤与胸腺嘧啶，鸟嘌呤与胞嘧啶。因此 DNA 分子中有一个鸟

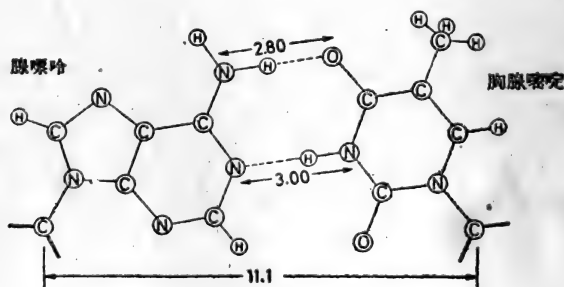


图3 腺嘌呤和胸腺嘧啶间的氢键

嘌呤时,也必定有一个胞嘧啶,同样有一个腺嘌呤时,也必然有一个胸腺嘧啶,也就是說 DNA 中的鳥嘌呤和胞嘧啶的当量相等,腺嘌呤的当量和胸腺嘧啶的相等。不同来源的 DNA 的大量分析結果証明这是大致正确的,虽然在不同来源的 DNA 中,腺嘌呤与鳥嘌呤的比例可以有很大的差別(图 3,4)。

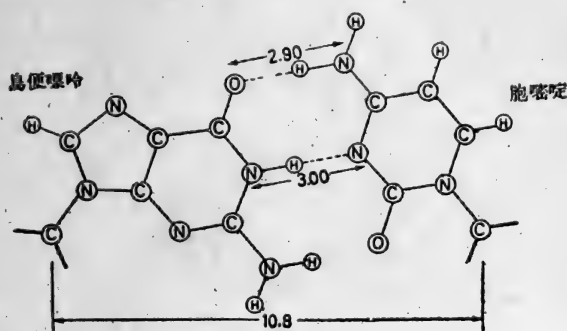


图 4 鳥嘌呤和胞嘧啶間的氢鍵

这結構对碱基对的順序沒有限制性;任何一对碱基对他邻近的是什么碱基沒有限制性,这是由于碱基都是扁平的,而且上下相叠。

以上的假說为許多人的 X 綫衍射的工作所支持,尤其是 Wilkins^[12] 及其同工的工作。

在进行 X 綫衍射观察时,需将 DNA 鈉盐制成纖維状晶体。制法系将一針尖从核酸的硬凝胶中徐徐牵引而出,便可以制成具有高度排列性的纖維状晶体,使用不同的牵引速度及不同含水量的凝胶可以制出直径为 $1\sim 100\mu$ 的纖維。改变纖維周围的大气相对湿度可以得到两种类型的 X 綫衍射图譜。湿度为 75% 时,纖維的含水量为其干重的 40~45%,纖維具有高度的結晶性, X 綫图譜呈多至 100 个衍射点。这种核酸型名为 A 型(图 5)。相对湿度达 92% 时,核酸具有另一結構,称为 B 型(图 6),其 X 綫衍射点不甚清晰,显示結晶不完善,但在子午綫 3.4 \AA 处有相当强的衍射点。A 和 B 两型間的轉变是可逆的。

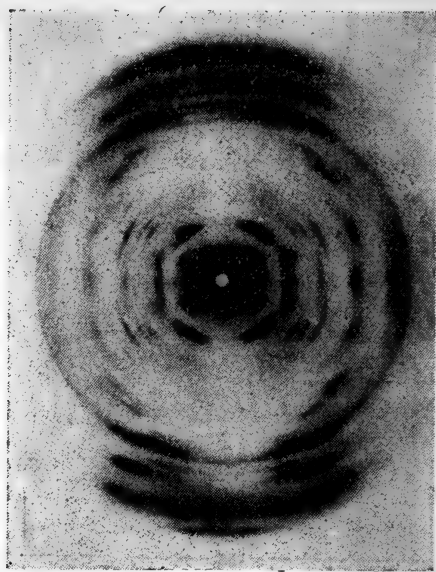


图5 DNA 鈉盐的A型晶体的 X 綫衍射图谱

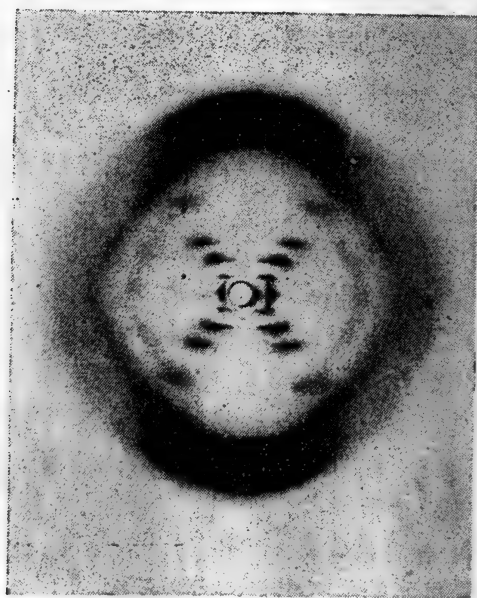


图6 DNA 鈉盐的B型晶体的 X 綫衍射图谱

来源于大肠杆菌及小牛胸腺的 DNA 鈉盐的 X 綫图谱分析，一般地証实了 Watson-Crick 結構的主要論点。

更精确的 X 綫研究指出，虽然 Watson-Crick 結構大致上是正确的，但它的 Fourier 轉变計算和 X 綫图谱不符合，因此需要一些修正。修正主要在分子的大小。Watson-Crick 认为 DNA 分子的直径为 20 \AA ，此数值过大。

以后，使用 DNA 的鋰盐及鉍盐以代替鈉盐进行 X 綫的研究，在技术上有了改进。鋰盐的 B 型能結晶，其 X 綫图谱显示清晰衍射点，可以准确地加以測量。鋰盐的另一有利之点是鋰离子的散射光强度較鈉离子弱三倍，因此在計算散射强度时，可以略而不計。

DNA 的 A, B 两型的不同可以列表說明如下 (表 1 及图 7)。

表 1 DNA 的 A, B 二型的区别

	A	B
直径 \AA	18	17
二鏈間距离 \AA	14	13
螺綫距 (Pitch) \AA	28.1	33.1 \AA (34 \AA)
各鏈每一圈的核苷酸数目	11	10
碱基对形状	棒状	棒状
碱基对螺旋軸角度	約 65° , 不通过軸	90° , 通过軸

DNA 的构型除了上述二型之外，目前还知道有另外两型，一共是四种构型。四种构型都是双股螺旋，而且可以互相轉变。它們不同之点在于每圈的核苷酸数目不同 ($9.3 \sim 11.0$ 个)，以及碱基对和螺旋軸間的角度不同。

最近 Pauling 及 Corey^[13] 指出胞嘧啶与鳥便嘌呤之間可能有第三个氢鍵存在 (图 8)。这第三个氢鍵是鳥便嘌呤的氨基氢和胞嘧啶的酮式氧所构成的。第三个氢鍵的存在使鳥-胞碱基对較腺-胸碱基对为稳定。不同成分的 DNA 的热变性証实这一假定。鳥-胞含量較高的 DNA，其变性温度也較高。

2. 电子显微镜的观察 近年来电子显微镜的分辨能力有很

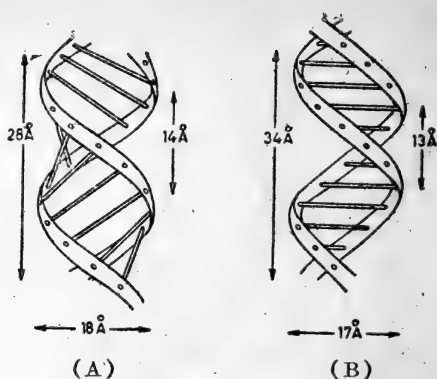


图7 DNA 鈉盐的 A,B 二型的主要区别示意图

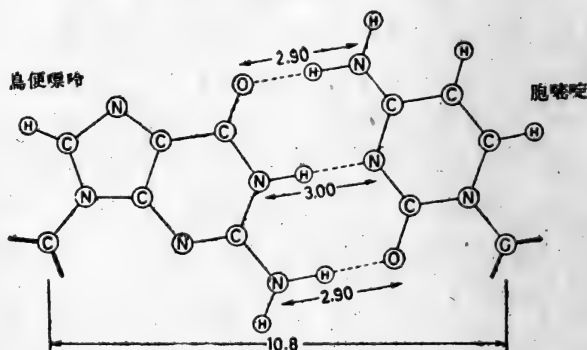


图8 鳥嘌呤及胞嘧啶間的第三氢鍵

大的进步，可以达到 10 \AA 以下。用电子显微镜可以直接观察核酸的形状及大小，在和理化性质测定的互相印証中，有很重要的意义。但我們不应忘記，尤其是在分子大小的解释上，所观察的是干燥的样品。

在核酸的电子显微镜观察中，Hall^[14,15] 提出的样品制备方法較好。这个方法的主要特点是将 DNA 鈉盐用喷雾器噴布在云母薄片上，以鉑投影，再于鉑上沉积一层氧化矽，最后以溶于乙酸戊酯的火棉胶噴布于表面上，干燥后将薄片在水中和云母片分开。以此法制备样品测得 DNA 鈉盐分子的直径是 $25 \pm 5 \text{ \AA}$ ，和 X

綫衍射所得的結果相当符合。

Hall 等^[16]在极力避免核酸变性的措施下,进一步詳細研究了 DNA 鈉盐。他們証实 DNA 鈉盐分子的直径是 20 \AA , 并观察到分子的末端是方形的, 表示末端仍保持双螺旋結構。假如双螺旋的两条鏈在末端分开, 則分离的单核苷酸鏈会卷曲起来。

图 9 c 是两个 DNA 分子, 其长度較一般的为短, 值得注意的是尖端的卷曲。Hall 及 Litt^[16]认为这是尖端发生部分变性的結果, 此种卷曲都发现在尖端, 而不发生在中間部分, 这可能表示双螺旋的断裂都是从尖端部分开始, 而向内发展。这一点支持 DNA 是連續鏈的假說。

图 9 d 是 DNA 的超声波断裂碎片。以特性粘度法測定的重均分子量是 9.7×10^5 , 而电子显微鏡得出的数均分子量是 4.2×10^5 , 重均分子量是 7×10^5 (假定质量对长度的比值是 200)^[17]。分子都是橫切折断的, 尖端沒有卷曲。此点証实 Doty 等^[18]的观点, 即超声波碎片仍保持双螺旋結構。又从图上可以看到当粒子彼此間距离較远时, 其形状一般是直的; 当它們挤在一起时則趋于弯曲, 此点說明分子略有柔韌性。

(二) 液体中的观察 上述 X 綫衍射和电子显微鏡的观察是对固态样品的观察, 而天然状态的 DNA 都是在溶液中的, 因此研究 DNA 在溶液中的性质, 如大小、形状、分子量、剛性等, 可以和固态的观察結果互相印証, 从而更正确地了解 DNA 在天然状态下的結構。

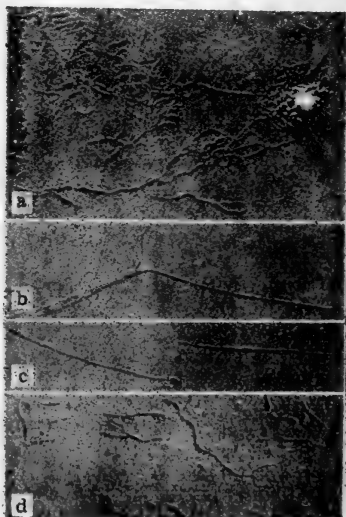


图 9 鮭魚精子 DNA-Na 的电子显微鏡摄影 (\times 約 100,000 倍)

(a) 相对高浓度情况下; (b) 有分支的分子(两个); (c) 显示由于变性而引起的末端增厚(二分子); (d) 經超声波打碎的片断。

DNA 溶液理化性质的测定存在着一定的困难。早期的工作由于抽提方法不够完善，产品有了降解或变性。使用这种材料进行的理化性质测定的结果是不正确的，而且各工作者所获得的结果也不一致。在水中，DNA 的浓度小于 2×10^{-4} M 或溶液中 NaCl 的浓度小于 10^{-3} M 时，则 DNA 发生不可逆的变性。因此先将 DNA 溶于水中，然后再加入电解质，或将 DNA 溶液对水过净地透析都应当避免。早期的工作者未注意到这一点，也是造成误差的原因之一。

以目前最好的方法制备的 DNA 在分子量，甚至在构型和化学组成上都是不均一的，所以理化性质的测定数值只具有统计学意义。

DNA 溶液的准确测定还存在着困难。目前浓度的测定是根据磷含量的分析或紫外綫吸收的测定，但是这些测定都是根据固体 DNA 鈉盐样品的重量计算的，而 DNA 鈉盐的含水量不能准确知道。在 110°C 烘箱中，或在较低温度真空干燥至恒重都不一定能把水分完全去掉。

以上的情况是在 DNA 理化性质测定中应当注意到的。

1. 脱氧核糖核酸鈉盐的分子量 测定 DNA 鈉盐分子量的方法有三个：(1)用 Svedberg 公式从沉降系数和扩散系数计算；(2)用 Mandelkern, Krigbaum, Scheragar 及 Flory 公式从沉降系数和粘度计算；(3)用光散射法。

(1) 以沉降系数和扩散系数计算：利用 Svedberg 公式

$$M = \frac{RTS_0}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

可以计算分子量，式中 S_0 代表样品浓度外推至零时的沉降系数， D 代表扩散系数， \bar{v} 代表微分比容， ρ 代表溶剂密度， R 代表气体常数， T 代表绝对温度。

S 值是用超速离心机测出的。早期的核酸工作者业已发现 DNA 在浓度低于 2.5×10^{-3} g/ml 时(在 0.2 M NaCl 中)，沉降系数对样品浓度有显著依赖性。当 DNA 浓度大约在 3×10^{-4} 克/

毫升以下时,沉降系数即迅速上升^[19~22],使外推至浓度为零时的数值难于准确(图 10),但是在这样低的浓度常用的、利用折射率的差别进行摄影的光学系统(如 Philpot-Svensson 光学系统)便不能摄出图象。克服这个困难的方法是增加测定液的厚度和利用更灵敏的光学系统。

Oth^[21] 和 Coates 及 Jordan^[20] 使用液柱为 30 毫米的沉降槽测定了以去污剂法提取的小牛胸腺 DNA 的沉降系数,结果 S_{20}^0 是 29.4 S。样品浓度的范围是 $6.3 \sim 12.6 \times 10^{-5}$ 克/毫升。

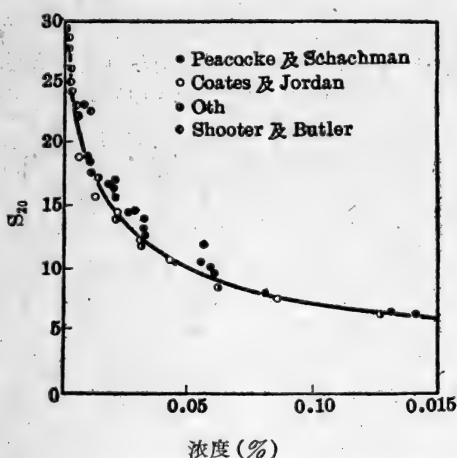


图 10 浓度对小牛胸腺的 DNA 钠盐的沉降系数的影响

Shooter 及 Butler^[22~25] 使用紫外光光学系统,同样测定了以去污剂法制备的小牛胸腺 DNA 钠盐的沉降系数,结果 S_{20}^0 为 29 S,与 Oth 等所得的结果很符合。彼等也测定了另一以酶法制备的小牛胸腺 DNA 钠盐样品,结果 S_{20}^0 为 24 S (图 11)。

Stern 及 Atlas^[26] 曾经研究了 NaCl 浓度对 DNA 钠盐沉降系数的影响。Kahler 及 Shack^[27] 研究了 $MgCl_2$ 浓度对 DNA 钠盐沉降系数的影响。他们都发现当电解质浓度增加时,沉降系数即迅速上升,NaCl 浓度增至 0.2 M 时,沉降系数便不再上升,而 $MgCl_2$ 浓度则只需增至 0.05 M (图 12)。

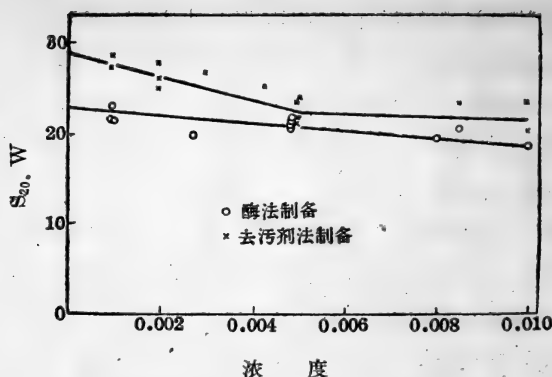


图 11 低浓度的 DNA 钠盐对沉降系数的影响
(在 0.2 M NaCl 中)

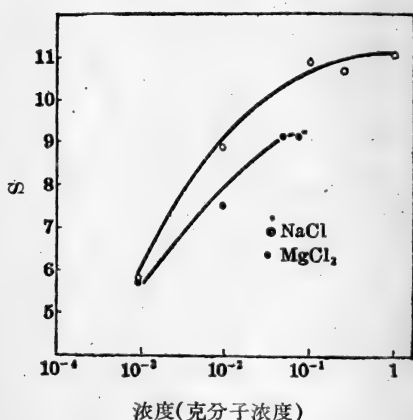


图 12 电解质浓度对 DNA 钠盐的沉降系数的影响

浓度对沉降系数的影响也因 DNA 钠盐来源的不同而异。从肠炎沙門氏菌的噬菌体 D₄ 制备的 DNA 钠盐在沉降中浓度对沉降系数的影响很大,以致外推至无限稀释成为不可能,虽测定浓度稀至 1×10^{-5} 克/毫升亦无济于事。

DNA 钠盐的扩散系数测定有很大困难。原因之一是 DNA 钠盐分子的不对称性较大,因此浓度对扩散系数有很大影响,以致

扩散图谱发生倾斜。基于标准高氏曲线获得的计算公式在应用于这种不标准的倾斜图谱时便发生误差。在文献中，DNA 扩散系数的研究为数不多。根据 James^[28] 以及 Coates^[29] 的比较可靠的研究，DNA 的扩散系数当为 $2\sim 3\times 10^{-8}$ 平方厘米/秒。

按 Svedberg 公式，用 $D=2\times 10^{-8}$ 和 $S_{20}^0=24\text{ S}$ （用酶法制备的小牛胸腺 DNA 钠盐的数值），算出小牛胸腺 DNA 钠盐的分子量是 6×10^6 ，如用 $D=3\times 10^{-8}$ 与用去污剂制备的小牛胸腺 DNA 钠盐样品的沉降系数（29 S）计算，分子量则为 5×10^6 。

由于不易得到可靠的扩散系数数值，因此有人将沉降系数与其他数据合并来计算分子量。最常用的是将沉降系数和特性粘度合并使用。

（2）以沉降系数和特性粘度计算：可用 Mandelkern 等的公式从沉降系数和特性粘度计算 DNA 的分子量。Mandelkern 公式可写成

$$M^{\frac{2}{3}} = \frac{S^0[\eta]^{\frac{1}{3}}}{\beta} \cdot \frac{\eta_0 N}{(1 - \bar{v}\rho)}$$

式中 M = 分子量， $[\eta]$ = 特性粘度， η_0 = 溶剂粘度， N = Avogadro 常数， β 是一个常数，其数值与分子的轴比有关。轴比为一时（球形），它是 2.12×10^6 ；分子为无规线团时，它是 2.6×10^6 ；分子是高轴比的刚性棒时，它是 3.6×10^6 。

各工作者所报告的小牛胸腺 DNA 钠盐的特性粘度数值不尽一致，多数在剪率为零时的数值是 $3\sim 6\times 10^3\text{ c.g.s. 单位}$ 。

由于 β 值和轴比有关，在用本公式时需要对 DNA 的分子形状及刚性作出假定。多数工作者在用此公式时多假定 DNA 分子为无规线团而采用 $\beta=2.6\times 10^6$ ，但它是否具有足够的柔韧性来形成这种构型是值得怀疑的。

用本法测出的小牛胸腺 DNA 钠盐的不同样品的分子量是 $6\sim 12\times 10^6$ ，与用其他方法测得的在同一范围。

（3）光散射法：光散射法特别适合于较高分子量的测定，因此较适用于核酸。使用光散射法不但可以测定分子量，同时对分

子的大小和形状亦能有所了解。应用于核酸时，一般都在几个不同的样品浓度测定其不同角度的光散射强度，然后按 Zimm 氏图解法以 $\frac{KC}{R_\theta}$ 对 $\sin^2 \frac{\theta}{2} + kC$ 作图，从而得到两组曲线，一组是同一浓度在不同角度的曲线，一组是同一角度在不同浓度的曲线。两组曲线皆外推至零，得到两条新曲线，即一条是 $C=0$ 的曲线，另一条是 $\theta=0$ 的曲线。两条曲线的交点， $\left(\frac{KC}{R_\theta}\right)_{C=0, \theta=0}$ ，即分子量的倒数 $\frac{1}{M}$ 。以光散射法测出的是重均分子量。

不同角度的光散射强度(以 Rayleigh 比值 R_θ 表示) 和浓度(c), 粒子散射因素 $[P(\theta)]$ 及分子量(M)的关系如下:

$$\begin{aligned}\frac{KC}{R_\theta} &= \frac{P^{-1}(\theta)}{M} + 2BC \\ R_\theta &= \frac{i_\theta r^2}{I_0} \\ P^{-1}(\theta) &= 1 + \frac{1}{3} h^2 R_g^2 \\ h &= \frac{4\pi}{\lambda'} \sin \frac{\theta}{2}\end{aligned}$$

式中K及B为常数, i_θ 为在角 θ 的光散射强度, r 为样品与光强度测定仪器(如光电倍增管)间的距离, I_0 为入射光强度, R_g^2 为均方半径, λ' 为溶液中光的波长。

在光散射测定中, 溶液的除尘是一主要而困难的问题。除尘的彻底与否对测定的结果有很大影响。

DNA 钠盐分子量的大量数据是用光散射法获得的。据 Doty 等^[30] 估计用光散射法测定 DNA 钠盐的准确度是 $\pm 12\%$, 而 Sadron 等^[31] 估计为 $\pm 15\%$ 。在计算中, 各工作者所采用的比折光率增加值有所不同, 大多数人采用 $0.188^{[32]}$, 而 Cavalieri 等^[33] 则采用 0.191 。

不同来源的 DNA 钠盐的分子量有相当大的差别(表 2)。这可能表示不同来源 DNA 的分子量确是不同的, 但也有可能是不同

表 2 用光散射法测定的不同来源的 DNA 钠盐的分子量

来 源	制 备 方 法	$M \times 10^{-6}$	参 考 文 献
大肠杆菌	去污剂法	7.0	[41]
Arbacia lixula	Chargaff	2.3	[42]
大肠杆菌	Chargaff	9.1	[42]
鸟类结核杆菌	Chargaff	14.4	[42]
鲑鱼精子	Signer	6.0	[43]
鲑鱼精子	Mirsky	6.0	[31,44]
鸡红血球	Signer (CV 51)	11.6	[31,44,45]
鸡红血球	Signer (CV 78)	15.0	[31,44]
鸡红血球	未说明	4.2	[46]
肺炎球菌	未说明	7.7	[46]

同制备方法所造成的。即使是同一样来源的 DNA，如小牛胸腺 DNA，其分子量也有很大的差别。根据不同工作者使用光散射法测定的结果，小牛胸腺 DNA 的分子量可大致分为三种类型，即 3×10^6 ， 6×10^6 及 15×10^6 (表 2)。使用目前最好的提取方法制出的样品进行测定似乎显示小牛胸腺 DNA 的平均分子量是 $6 \sim 10 \times 10^6$ 。有人认为样品中残存的变性蛋白质可能起交联剂的作用，以致造成分子量的差别^[34]。

Sadron 等^[31]认为一切组织的 DNA 都具有同一的分子量。此论点由于数据不够多，尚不能下结论。

2. 脱氧核糖核酸在溶液中的分子构型 一般研究高分子构型的方法是通过光散射、粘度、流动双折射、扩散系数、沉降系数等的测定了解分子的形状，然后选择一适当流体力学模型，按照一定的公式计算分子的大小。

根据 Watson-Crick 的模型，DNA 似乎应当是一刚性棒。以 DNA A 型晶体的核苷酸间距离为 2.6 \AA ，B 型的是 3.3 \AA ，假定在溶液中仍保持 Watson-Crick 结构，并假定分子量是 7×10^6 ，核苷酸的平均分子量为 300；则 DNA 的长度应当大约是 $30,000 \text{ \AA}$ 。其轴比应为 1.7×10^3 。但 DNA 轴比的实际测定，各

工作者所得的結果虽不很一致，大致都是数百。茲将一些工作者所使用的方法和結果列表如下(表 3)。

表 3 DNA 离子的軸比

作 者	方 法	軸 比
Signer, Caspersson 及 Hammastén ^[35]	粘度+流动双折射	300
Tennent 及 Vilbrandt ^[36]	S + D } 用 Perrin 公式	120
Cecil, Ogston ^[37]		170~400
Kahler ^[38]		284
Peacocke 及 Schachman ^[19]	S + $[\eta]$ M	300
Mathieson 及 Matty ^[39]	$[\eta]$ (用于刚性棒的 Simha 公式)	416
Goldstein 及 Reihman ^[40]	流动双折射, Perrin 公式	354~755

有关 DNA 离子在溶液中的构型的大量数据得自光散射测定。散射光的角分布数据的解释存在一些困难，需要假定适当的模型。Doty 等^[32]的大量工作指出在溶液中 DNA 离子既不是刚性棒，也不是无规綫团，它的行为介于这两极端之間，因此称之为坚硬的无规綫团。Rowen^[47] 則称之为稍具柔韧性的棒。

下表是三个小牛胸腺 DNA 鈉盐样品的分子量度(表 4)^[32,40]。

表 4 DNA-Na 的分子量度

样 品	$M \times 10^{-3}$	$\sqrt{R^2}$ Å	$\sqrt{R_g^2}$ Å	L Å	θ sec ⁻¹	2a Å	$[\eta] \times 10^{-3}$ c.g.s. 单位	$R[\eta]$ Å
Signer(SVIII)	5.90	5,400	2,200	28,000	21.2	10,900	5.1	5,240
Signer(VI)	6.85	5,030	2,050	33,000	4.64	19,000	4.8	5,400
Detergent(SB1)	5.85	4,950	2,020	28,000	18.2	11,200	5.34	5,300

M = 分子量光散射法算出；

$\sqrt{R^2}$ = 均方两端距离，光散射法；

$\sqrt{R_g^2}$ = 均方半径，它是分子中各节段的质量和它們对重心的距离的平方的乘积的总和，从光散射的 Zimm 图解法中求出；

L = 分子外形长度，設每两核苷酸的长度为 3.3 Å；

θ = 旋轉扩散系数；

2a = 由 θ 計算的主軸长度；

$[\eta]$ = 在剪率为零时的特性粘度；

$R[\eta]$ = 由粘度計算的均方两端距离。

图 13 是 DNA 鈉盐的 Zimm 氏图解。

均方半径可以从 Zimm 氏图解法直接算出,即从浓度为零时的曲线的斜率利用下式算出。

$$\sqrt{R_g^2} = \frac{3}{16\pi^2} \left(\frac{\lambda_0}{n_0} \right)^2 \frac{\text{斜率}}{\text{截距}}$$

式中 λ_0 为入射光波长, n_0 为溶剂的折光率。三个样品的均方半径都在 2000 Å 左右,显示离子极大(按重量而言),因此是高度舒张的。

均方两端距离 $\sqrt{R^2}$ 是在分子是无规綫团的假定下,从光散射数据計算的。此值为 Z-平均量度,即相当于 Z-平均分子量的平均量度。

$R_{[c]}$ 是以剪率为零时的特性粘度(依 Flory 及 Fox^[48] 公式計算)計算的均方两端距离。此公式假定分子是无规綫团,且分子量的分布范围不宽至引起明显的誤差。計算值和用光散射数据計算的相当符合。

上表列有旋轉扩散系数,以及用它計算出来的主軸长度。这两个数值是 Goldstein 及 Reichmann^[40],在假定分子容积是无水分子容积的情况下,从 DNA 鈉盐溶液的流动双折射的測定算出的。

超声波处理可以将 DNA 打断为完整而长度不同的片段。Doty 等^[49]曾經測定經超声波冲击的胸腺 DNA 的沉降系数、粘度及光散射行为。他們发现片段的沉降系数及特性粘度与重均分子量間存在下列关系:

$$S_0^{20} = 0.063 M_w^{0.37}$$

$$[\eta] = 1.45 \cdot 10^{-6} M_w^{1.12}$$

在特性粘度 $[\eta]$ 式中,重均分子量 (M_w) 的指数是 1.12,比无规綫团的极限数值 1.0 略高,在沉降系数 (S_0^{20}) 式中, M_w 的指数是 0.37,接近无规綫团的低限数值 0.33。此外,均方半径和分子量有着下列关系:

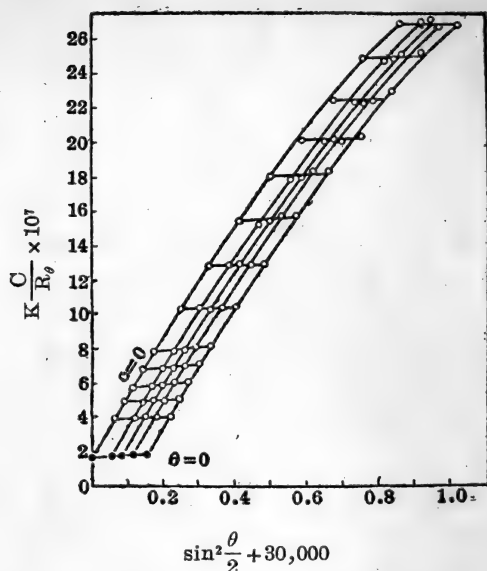


图 13 在 0.2 M NaCl 中, DNA 鈉盐的 Zimm 氏图解。

$$\sqrt{R_g^2} = 8.3 \cdot 10^{-9} M^{0.5}$$

M_w 的指数是 0.5, 符合无规綫团应有的数值, 如系刚性棒, 則此值应为 1。这些事实也說明 DNA 离子在溶液中的构型介于刚性棒与无规綫团之間。

上述的 DNA 分子构型要求它具有一定的柔韌性。电解质对 DNA 离子的作用說明它确是如此。Jordan 及 Porter^[50] 和 Cavalieri, Rosoff 及 Rosenberg^[33] 研究了在較低电解质浓度时 DNA 特性粘度的改变, 結果显示 DNA 离子的大小随 NaCl 浓度的不同而有所改变 (图 14)。Jordan 及 Porter 根据 DNA 离子在 NaCl 溶液浓度为 $4 \times 10^{-4} M$ 及 $10^{-3} M$ 时的特性粘度, 使用 Flory-Fox 公式^[48] (假定分子是无规綫团) 和 Simha 公式^[51] (假定分子是刚性棒), 計算了 DNA 离子的长度比值, 結果如下 (表 5)。

表 5 DNA 离子的长度比值

計 算 方 法	离子浓度, NaCl	比 值
Flory-Fox (无规线团)	4×10^{-4} M 及 10^{-1} M	0.82
Simha (刚性棒)	4×10^{-4} M 及 10^{-1} M	0.72
光散射	及 2×10^{-1} M	0.66

以上结果显示当 NaCl 浓度由 4×10^{-4} 增至 1×10^{-1} 时, DNA 离子长度收缩至原来的 $3/4$ 。Geiduschek^[53] 以及 Rowen^[47] 用光散射法所得的数据证实了 Jordan 等的结果。

DNA 的柔韧性是如何获得的, 目前还不了解。有人认为在 DNA 链上有不成对的碱基, 形成在结构上较弱的、可弯曲的点, 但目前还没有实验证据。又有人认为在 DNA 链上有断裂之处, 因此可以弯曲, 不过目前一般认为组成 DNA 的两股链都是连续的完整链。

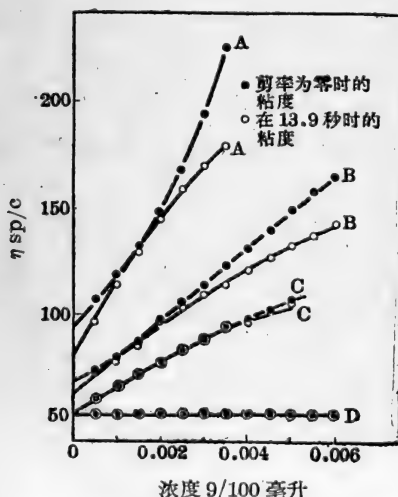


图 14 在不同浓度 NaCl 中 DNA 钠盐浓度对特性粘度的影响。(A) 4×10^{-4} M NaCl; (B) 1×10^{-3} M NaCl; (C) 4×10^{-3} M NaCl; (D) 1×10^{-1} M NaCl。

(三) 脫氧核糖核酸的变性作用 核酸分子中的主要化学鍵有两类：(1)核苷酸間的共价多酯鍵；(2)嘌呤及嘧啶环間的氢鍵，此类鍵对核酸分子的双螺旋結構起稳定作用。核酸的变性作用主要是指氢鍵的断裂，而分子量不变这一过程。核酸的变性可以用四种方法引起：(1) DNA 溶于水或极稀电解质溶液；(2)溶液的酸碱度調節至一定程度；(3)加热；(4)加入破坏氢鍵的試剂。变性作用的观察可以对 DNA 的結構提供論証。

1. 脫氧核糖核酸溶于水或极稀电解质溶液所引起的变性 将 DNA 溶于水或极稀电解质溶液中可以引起变性。这种变性作用可以用紫外綫吸收光譜的改变来追踪。天然状态的 DNA 的磷原子消光系数 $\epsilon(P)$ 在 259 毫微米时約为 6600, 变性时則增加。Thomas^[53] 的試驗指出, 如将溶于 1 M NaCl 的 DNA 溶液稀释达 NaCl 浓度約为 $1 \times 10^{-3} M$ 时, 溶液的紫外綫吸收光譜即开始上升, 至 NaCl 浓度大約为 $1 \times 10^{-4} M$ 时达到最高点, 此时其升高的数值約为其原来的 25%; 如再加入 NaCl 至开始的浓度, 則光密度下降, 但不能恢复到原来的数值, 而高出原值約 11% (图 15)。Thomas 认为光密度不能恢复至原来的数值表示发生了不可逆的变性作用。因此在核酸的提取制备中必需充分注意电解质的浓度, 不使降至过低而发生不可逆的变性作用。样品的光密度或 $\epsilon(P)$ 值可以作为变性的指标。

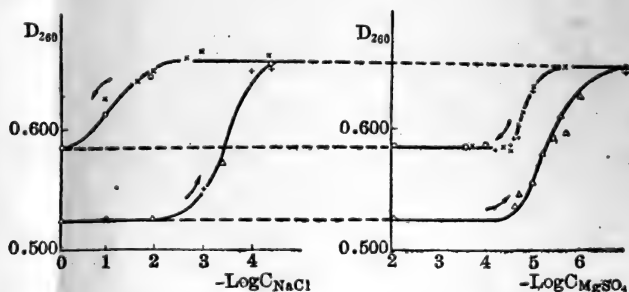
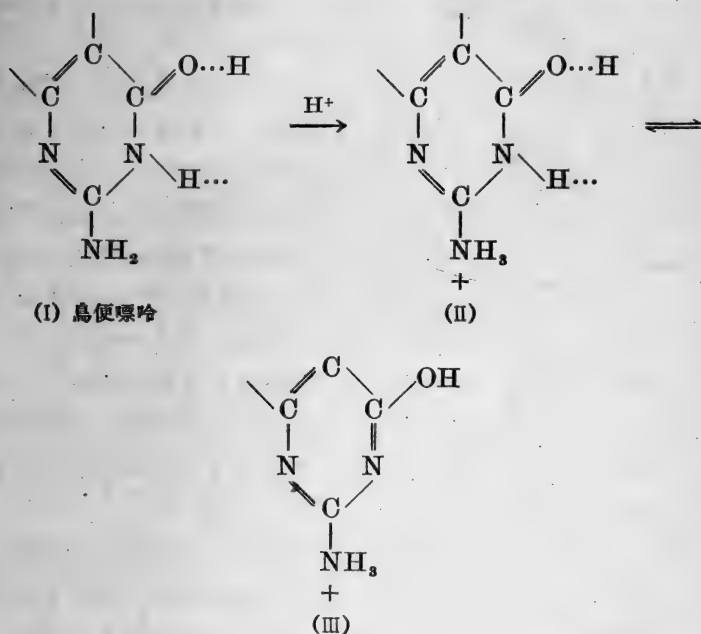


图 15 增加或降低电解质浓度对 DNA 在 260 毫微米的光密度的影响

Cavalieri, Kosoff 及 Rosenberg^[33,54] 曾經研究过除去电解质所引起的变性作用的机制問題。他們认为这种变性作用和加酸所引起的一样,是质子与 DNA 的碱基結合的結果。质子加入到鳥便嘌呤的氨基,并引起邻近氢鍵的断裂。但是这还不能解释为



什么只有鳥便嘌呤受到影响,以及为什么质子加入后便引起氢鍵的断裂(II~III)。

2. 酸或碱引起的变性作用 酸或碱可以引起 DNA 的不可逆变性。如将原来 pH 是 6~7 的 DNA 鈉盐用酸或碱分別滴定到 pH 2.5 或 pH 12,則在逆滴定时,滴定曲綫与原滴定曲綫不重叠,說明 DNA 发生了不可逆的变化 (图 16)。这现象可以用 DNA 的氢鍵結構解释。从图 16 可以看出,在順滴定时非緩冲地带較宽 (pH 4.5~11.0),而在逆滴定时非緩冲地带較狹。这是由于核碱的氨基和—NH—CO—基結合,生成氢鍵,在滴定到一定酸碱度时,氢鍵方始断裂,因此在順滴定时非緩冲地带較宽;达到一定酸

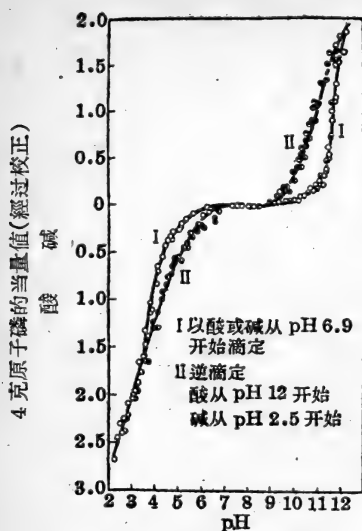


图 16 小牛胸腺的 DNA 钠盐的滴定曲线

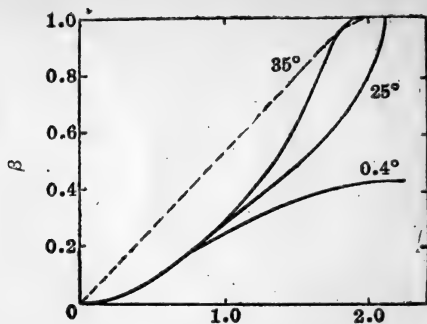
较小。有关可逆性和氢键断裂的百分数的资料主要来自电位滴定及温度对酸碱变性的影响。

Cox 及 Peacocke^[55,56]研究了在顺滴定过程中把 pH 降低到一定数值并逆滴定至中性的滴定曲线，从而估计引起不可逆变性过程中氢键断裂的数目。把在 25°C，中性，存在有 0.05 M NaCl 的 DNA 溶液加酸滴定，使 pH 由中性下降至不同数值，如 E' 及 E，然后加碱逆滴定，可以在顺滴定曲线 APD 和逆滴定曲线 DRA 之间得到一系列曲线，如结合的酸不超过每 4 克原子磷 0.2 当量（即达图 17 E'），则逆滴定曲线和顺滴定曲线重合，即，在 25°C，最初的 10%、以氢键结合的氨基的离解是可逆的。从滴定曲线看，氢键的断裂不超过此量，DNA 可以恢复到原来的天然状态。氢键的断裂如超过此值，则 DNA 的结构产生永久性改变，此时，逆滴定曲线和顺滴定曲线不重合。例如，顺滴定至 E，则逆滴定曲线顺 EFA 进行。EFA 表示 DNA 发生了部分变性。

酸碱所引起的变性作用与温度有关；温度较低则引起的变性

碱度时，氢键断裂，释出的基团迅速被滴定，pH 的改变就比较徐缓。当氢键业已被断裂，如在逆滴定时，则质子和基团间的结合不再受氢键的阻碍，非缓冲地带因此较狭。

变性的程度决定于氢键破坏的多寡，氢键破坏至一定程度则发生不可逆的变性。如果氢键破坏较少，两条多核苷酸链仍能保持其相对的位置，从而中和后，氢键可以重新形成，则变性成为可逆。但是，可逆的变性并不一定意味着恢复到原来的样子，因为中和后所形成的氢键可能特异性



每4克原子磷結合的酸当量

图 18 在不同温度，結合酸量与不可逆断裂的氢键分数(β)的函数关系；虚线表示如果在变性时，氢键的断裂都是不可逆的情况下， β 与結合酸量的关系。

及 Preston^[57]，在 -0.75°C 时， β 始終为零。

在不同温度的加酸滴定不仅是酸变性，同时也包含温度变性，因此加酸引起分子的全部变性时，氢键破裂的临界数值是温度的函数。Cavalieri^[58] 等工作指出(图 19)，在一切温度下存在有共同的順滴定和逆滴定曲綫，它們是天然的和变性的 DNA 的可逆滴定曲綫，但是在順滴定曲綫上，从何处开始发生不可逆变性作用，則依温度而定。他們的結果和 Cox 及 Peacocke^[55] 的近似，因图 19 的 F' 及 F'' 等相当于图 17 的 E' ，因此在轉折点之前，滴定曲綫是可逆的，在轉折点之后，則不可逆。

这里还存在着一个爭論的問題，即在低温的加酸过程中，DNA 不易变性的原因是由于氢键虽然已經破裂，但热能較小，双螺旋的原来結構仍然保持，或是由于在低温下氢键破裂較少，还不了解。

在 DNA 溶液中加入酸或碱，除了可以观察到滴定曲綫的改变之外，也引起了 DNA 物理性质的改变。当 DNA 溶液的 pH 逐漸下降至 2.6 时，分子量未发生改变，但 DNA 离子有显著收縮^[59,60]。根据光散射的測定，在 pH 6.5, 3.0 及 2.6 时，DNA 离

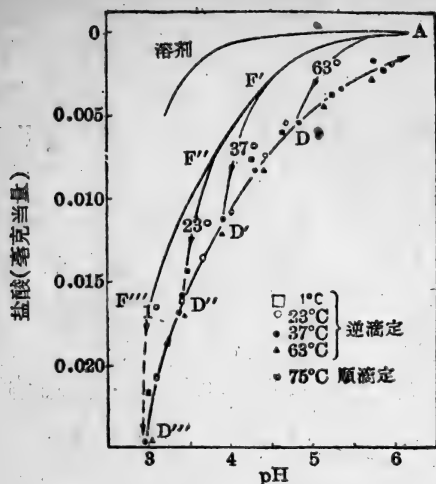


图 19 DNA-Na 在不同温度的滴定曲线。
各点表示不同温度的曲线、在 75°C 的顺滴定曲线相当于较低温度的逆滴定曲线。

子的均方半径分别为 2050 Å, 1770 Å 及 880 Å^[59]。加碱时也发生同样情况, 从光散射的数据计算, pH 7 时, 均方半径为 2600 Å ($\mu=0.165$), 在 pH 12 时, 下降至 950 Å, 变化和加酸时平行^[61]。在加酸或加碱时, 粘度也有改变。当 pH 达到约 3.7 时, DNA 溶液的特性粘度开始下降, 在 pH 3.7 和 2.8 之间有猛烈下降

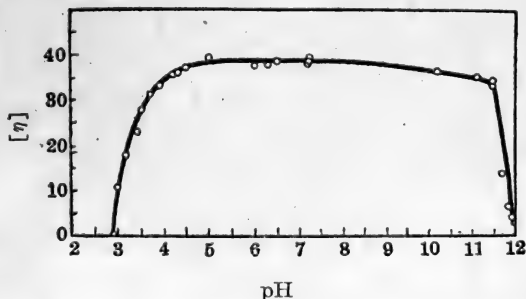


图 20 pH 对小牛胸腺的 DNA 钠盐的特性粘度的影响

(图20)^[39,62]。同样,特性粘度在pH达12时,开始迅速下降^[39,61]。此外,随DNA溶液的pH值的改变,紫外綫吸收也有所增加^[58]。这些物理性质的改变显示加酸或加碱引起了DNA氢键的部分断裂,并随氢键的断裂,DNA多核苷酸鏈可以自由形成无规綫团,以及柔韧的构型。

3. 加热所引起的变性作用 DNA溶液加热时可以发生不可逆的变性作用。这种变性只在一定临界温度之上发生^[53]。临界温度的高低和离子强度以及DNA的天然状态和来源有关。临界温度的范围是70~85°C。

如将DNA溶液在临界温度以上的某一温度加热一定時間,然后冷却至室温,則变性DNA的理化性质与未变性的有显著的不同。例如,将小牛胸腺DNA(离子强度0.15,中性pH)在100°C加热,特性粘度即由原来的72下降至4;均方半径由原来的3000 Å下降至1000 Å,但数均分子量($M_w = 7.7 \times 10^6$)及沉降系数 $[S_{20}^{20}(10^{13}) = 21]$ 均不改变^[63]。可见热变性的DNA的性质更接近于无规綫团。

如将DNA溶液在临界温度以上的不同温度加热一定時間(20分钟),冷却至室温后,測定其比粘度,則发现比粘度下降依加热温度的不同而各异。加热温度較高的,其比粘度下降較多。比粘度下降至一定程度即不再下降,虽延长加热時間也不改变(图21)^[64,65]。这可能是由于DNA分子是不均一的,当某些分子已完全变性时,另一部分可能完全没有变性。如果这是正确的,則DNA的热变性是一种“全或无”的过程。但另一可能是分子各部分氢键的稳定程度是不相同的。当某一温度时,某些氢键发生断裂,而其他部分則未断裂。如果这是对的,則热变性应具有中間阶段。目前一般似趋向于认为后者具有較多的理論依据。Marmue及Doty^[66]的試驗指出鳥-胞核碱間的氢键較腺-胸核碱間的为稳定。鳥-胞核碱含量較高的DNA的变性温度也較高。图22显示变性温度(T_m)是核酸的鳥-胞核碱含量的函数。当曲綫外推至鳥-胞核碱含量为零时,变性温度为69°C,此温度与合成的

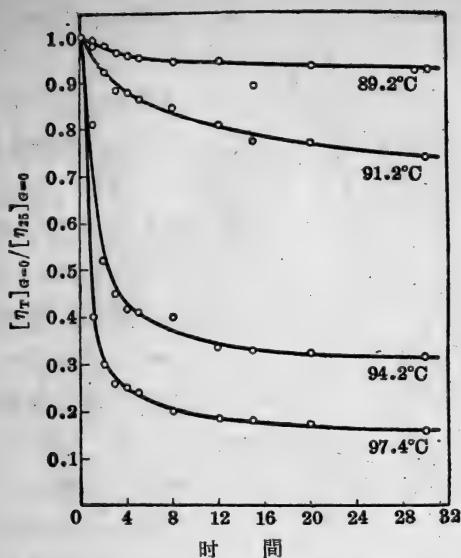


图 21 在不同温度、处理时间与 DNA-Na 特性粘度的关系。

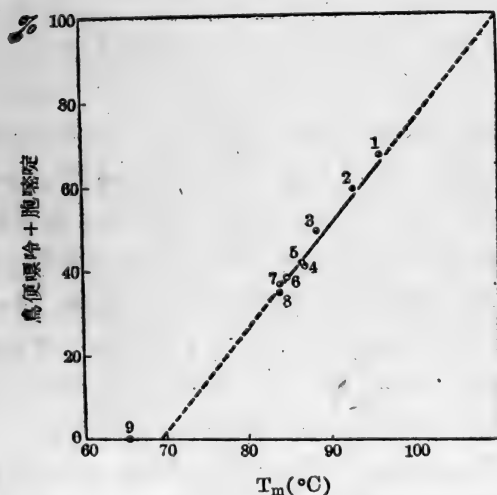


图 22 变性温度(T_m)与鳥嘌呤-胞嘧啶含量的关系

- 1.草分枝杆菌； 2.沙雷氏菌属； 3.大肠杆菌； 4.鮭魚精子；
5.小牛胸腺； 6.肺炎球菌； 7.酵母； 8.噬菌体 T_{4r} ； 9.只
含 A 及 T 的合成多聚核苷酸。

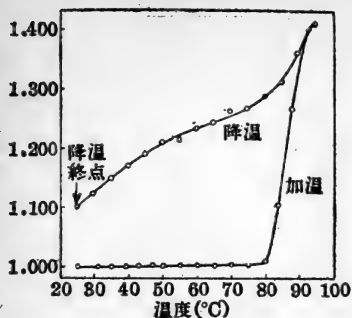


图 23 DNA 在加热与冷却过程中的紫外吸收改变

腺-胸 DNA 的变性温度极为符合。

加热变性的 DNA 溶液的紫外吸收增高,在溶液冷却后,紫外吸收有所下降,但远不能恢复原来的数值(图 23)^[65]。这说明当温度升高时, DNA 的核碱间的氢键遭到破坏,温度降低后可以有一部分氢键重新形成。氢键重新形成的程度与氢键破坏的程度

有关,破坏程度愈大,则恢复愈少。

变性作用发生的临界温度和溶液的离子强度有关^[53,67]。降低溶液的离子强度则临界温度也下降,也即电解质对 DNA 的加热变性具有保护作用。电解质的保护作用的临界浓度随温度的升高而显著增加。

4. 变性剂对脱氧核糖核酸的影响 脲、盐酸胍及水杨酸钠等能使蛋白质氢键断裂的物质应当也能促进 DNA 的变性作用。

Rice 及 Doty 研究了 8M 脲、3.2M 盐酸胍及 0.8M 水杨酸钠对 DNA 变性的影响。彼等指出,在加入这些物质时,加热变性的临界温度即下降(图 24)^[64]。脲的影响曾经相当广泛地研究过,但是不同工作者所得的结果有差别。Rice 及 Doty^[64] 发现,在室温,脲对有 0.15 M NaCl 存在下的 DNA 溶液的特性粘度无影响,但 Conway^[68] 则发现粘度上升, Mathieson 及 Porter^[69] 发现在含有 0.2 M NaCl 的 DNA 溶液中加入脲时,其流动双折射测定显示分子的柔韧性增加,表示有部分氢键断裂。

以上的结果以及其他的一些工作显示引起蛋白质氢键断裂的一些试剂,其本身并不能引起 DNA 的任何明显的变性,但它们可以在其他方法引起的变性作用中起辅助作用。

总之,以上几种变性作用的研究说明变性作用主要引起氢键

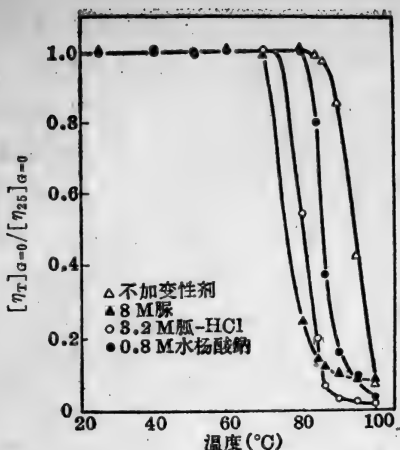


图 24 DNA-Na 在氢键破坏剂存在下加热一小时特性粘度改变

的断裂,以致原来的、较具有刚性的分子崩溃,变成具有较大柔韧性的形式。有些 DNA 在变性后,两条链由于残留的或是重新形成的氢键的存在,仍结合在一起而不分离,但近来也发现一些来源于细菌的 DNA 的变性之后,两链可以完全分开。因此从 DNA 变性的研究可以证实 Watson-Crick 所提出的 DNA 是由氢键维系的假说。

(四) 脱氧核糖核酸的稳定力 Watson-Crick 认为氢键是 DNA 稳定性的主要的甚至是唯一的因素。在以上各节也只介绍了氢键在 DNA 稳定性中的作用。目前已有不少研究说明氢键不是 DNA 稳定性的唯一来源。

相邻碱基对之间的非特异性吸引也有同样重要性。关于这方面的证据有以下两方面。首先,蛋白质的变性剂,如脲、胍、水杨酸盐等几乎对 DNA 没有变性作用。这些试剂是打断氢键的,因此氢键可能不是主要负责 DNA 稳定性的。其次,变性的统计力学处理要求有相当的、碱基对之间的、作用方向与长轴平行的相互作用,以便变性作用能发生在狭窄的温度范围之内^[70,71]。

从非水溶剂对螺旋结构影响的研究中,Helmkamp 及 Ts'o^[72]

研究了甲酰胺及二甲基亚砷的影响；Herskovits, Singer 及 Geiduschek^[73] 除了上述两种试剂之外还研究了二甲基甲酰胺及数种醇类的影响。这些结果都指出憎水力对螺旋结构的重要性。所有这些溶剂,如加入足量至水溶液中,都能使螺旋结构破坏,其用量可以表示脱稳定作用的强弱。最强的脱稳定剂是二甲基亚砷及二甲基甲酰胺,它们能接受氢键,但不能供给氢键,因为它们没有活泼的氢。醇类中甲醇及乙醇则较好。这些结果不符合氢键在稳定 DNA 的结构中起主要作用的想法,但符合憎水力的概念。根据憎水力的概念,有机溶剂的脱稳定作用是它们对螺旋内部嘌呤及嘧啶的较强吸引的结果。

Lerman^[74] 及 Luzzati, Masson 及 Lerman^[75] 研究了 DNA 和氮蒽、氮蒽橙及前黄素等染料的结合。此等染料的分子是扁平的,和 DNA 结合时,则结合在相邻碱基对之间,使螺旋伸长与硬化,伴以特性粘度的大量增加。沉降系数只有很少改变,说明没有发生聚合。这现象也符合上述的憎水力概念。

也应当考虑静电吸引力对 DNA 稳定性的作用。在中性 pH, 每一磷酸基团带有一个负电荷,因此螺旋上的电荷密度是相当大的。但由于一个碱基对的两个电荷间的距离约为 20 \AA , 它们之间可以有反离子造成的隔层。结果表现为在水溶液中,离子强度对变性温度有显著影响,例如在 0.1 M NaCl 中,小牛胸腺 DNA 的变性温度在 90°C 左右,在 0.001 M NaCl 中则降至室温。二价阳离子在隔断电荷的作用中更为有效,如 10^{-4} M MgSO_4 可以在室温使 DNA 稳定。

(五) 脱氧核糖核酸的降解 加热、酸碱、超声波、X 射线、DNA 酶等都可以引起 DNA 的降解,但降解的机制则不相同。

加热或加酸碱最初引起 DNA 变性,氢键断裂,继之以磷酸酯键断裂,引起降解,因此在大量降解发生前,螺旋的双链已大致分开^[76~79]。DNA 酶、超声波、X 射线的作用恰恰相反。以粘度及 260 毫微米紫外吸收追随上述处理过程的试验显示粘度已有相当大的下降时,260 毫微米的紫外吸收则并未上升^[80~84]。这说明在

降解发生后,氢键还没有明显断裂,双链结构仍是完整的。

在 DNA 的酶解过程中,酶解速度随时间而加速^[85]。这现象符合 DNA 是双链结构的理论。因为在开始时,双链的相应部分同时受酶的作用而断裂的可能性较小,但酶解过程继续下去的时候,这种可能性增加了。

从降解生成的片断的分子量与沉降系数之间或分子量与特性粘度之间的一定关系可以推测 DNA 的分子构型。在“DNA 在溶液中的分子构型”一节中已经提到 Doty 等的工作。Cox 等^[84]用 X 射线照射引起 DNA 的降解,结果指出分子量(M)与特性粘度($[\eta]$)服从以下关系: $[\eta] = kM^{0.93}$, 说明分子结构介于刚性棒(指数为 1.7)与无规线团(指数为 0.66)之间。

三、核糖核酸的结构

(一) 核糖核酸的 X 射线衍射分析 从 RNA 的浓溶液中用玻璃棒牵引的方法虽然也能得到 RNA 纤维,但不能摄得清楚的 X 射线衍射照片。这可能是由于分子的排列程度不佳之故。RNA 的 X 射线衍射照片如图 25 所示^[86]。来源于酵母、小牛肝脏、小牛胸腺以及烟草斑纹病毒的 RNA 的 X 射线衍射图谱都相似,这可能说明不同来源的 RNA 都具有相同的结构,但也可能照片还不够好,

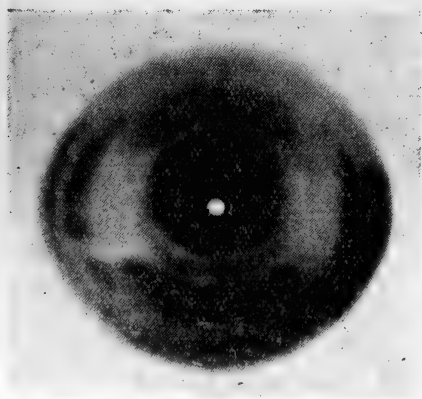


图 25 RNA 纤维的 X 射线衍射图

不能显示出細微的差別。

尽管 RNA 的 X 綫衍射图譜还不够好,但仍可以作出若干推論。图形在順着纖維軸的方向有 $3.3\sim 4.0\text{ \AA}$ 的規則間隔的衍射点。这和碱基对纖維軸作垂直方向的积叠有关。順纖維軸的重复距离是 $25\sim 28\text{ \AA}$, 而結晶型(A型) DNA 的則为 28 \AA , 半結晶型(B型) DNA 的則为 34 \AA 。此外图形尚显示在 $12\sim 14\text{ \AA}$ 有强的二級重复距离。在子午綫的 13 \AA 和 4 \AA 間沒有衍射点,这被认为是螺旋結構的表示^[86,87]。赤道綫衍射点不够清晰,因此难于准确地測定螺旋的直径,根据估計,在 $21\sim 25\text{ \AA}$ 之間。如此看来, RNA 和 DNA 的量度有显著的类似,但是,根据 X 綫衍射图譜不能証明 RNA 是双鏈抑或单鏈反折組成的双螺旋分子。Zubay 及 Wilkins^[88] 认为 RNA 可能类似 DNA 及多腺核苷酸的略为不規則的混合物,也有非螺旋区。

近年来,对合成多核苷酸有一些 X 綫衍射的研究。所有这些合成多核苷酸都具有螺旋結構,而且都是核碱在里面,糖-磷酸鏈在外面。多腺核苷酸形成双鏈結構。在中性,多腺核苷酸与多尿核苷酸互相盘繞形成螺旋复合体,其結構与 DNA 的相仿佛。但是天然 RNA 是否也具有相同的結構,則不能断言。很可能天然 RNA 在結構的規律性上比合成的 RNA 或天然 DNA 为差。

(二) 核糖核酸的核碱組成 在 DNA, 鳥嘌呤与胞嘧啶含

表 6 从組織及細胞中提取的一些 RNA 的克分子关系

組 織	腺 嘌 呤	鳥 嘌呤	胞 嘧 啶	尿 嘧 啶	$\frac{A}{U}$	$\frac{G}{C}$
牛肝	17.10	27.30	33.90	21.70	0.79	0.80
牛腎	19.70	26.70	33.40	20.20	0.97	0.80
鼠腎	19.40	29.50	30.70	20.40	0.95	0.96
海胆	22.56	29.42	27.19	20.82	1.09	1.09
酵母	25.40	24.60	22.63	27.37	0.93	1.09
粘质沙雷氏菌	20.30	31.20	24.30	24.10	0.84	1.28
大肠杆菌	25.30	28.80	24.70	21.20	1.19	1.16
单分枝杆菌	20.85	20.75	27.10	21.25	0.98	1.13

量之比,或腺嘌呤与胸腺嘧啶含量之比一般都等于1。但在RNA, 比值很少是1(表6)。这可能是由于RNA具有非螺旋区,以及具有不能配对的环状部分(成环作用,见下文)。

(三) 在溶液中核糖核酸的形状和大小 近年来, RNA 的提取方法已有很大进步。Fraenkel-Conrat^[89] 及 Gierer 及 Schramm^[90] 等已从烟草斑紋病毒中提取出具有感染性的核酸, 说明所得到的样品是处于天然状态的。

关于 RNA 的分子量过去有过争论。最近认为未降解的样品所测得的分子量一般皆超过 10^5 (表7), 早期获得的数值, 在 10^4 或 10^4 以下的, 表示样品有降解。烟草斑紋病毒核酸的分子量经过许多人的测定, 都认为在 2×10^6 上下。由此可见 RNA 的分子量并不比 DNA 的小太多, 如果烟草斑紋病毒 RNA 证明是单链螺旋, 则二者的一条多核苷酸链的分子量是很近似的。

RNA 离子的长度因溶液离子强度的改变而不同。Hopkins 及 Sinsheimer^[91] 以光散射法测出 RNA (烟草斑紋病毒) 分子的长度为 1600 \AA , 但加入电解质后收缩为 1050 \AA 。Boedtker^[100] 测出烟草斑紋病毒 RNA 的均方半径为 300 \AA , Timasheff 等^[98] 测出腹水癌的高分子 RNA 的均方半径为 320 \AA (在 0.02 M 磷酸钠及 0.08 M NaCl 中), 和全伸展时的长度比较, 说明分子不

表7 不同样品的 RNA 的分子量

来 源	分子量 $\times 10^{-5}$	测 定 方 法	参 考 文 献
酵母	1.0~3.0	沉降, 特性粘度	[91]
产气杆菌	1.5	光散射	[92]
鼠肝	2.64	沉降	[93]
牛肝	1~3	沉降, 特性粘度	[91]
烟草斑紋病毒	2.0~2.9	沉降, 扩散	[94]
烟草斑紋病毒	1.5~1.8	沉降, 特性粘度	[94]
烟草斑紋病毒	16	沉降, 特性粘度	[95]
烟草斑紋病毒	10~20	沉降, 特性粘度	[91]
烟草斑紋病毒	11	光散射	[96, 97]
腹水癌	11	光散射	[98]

是棒状,而是具有高度盘繞的构型。

Boedtker^[100] 指出 RNA 的特性粘度依离子强度而改变。如将烟草斑紋病毒 RNA 溶液的离子强度由零增至 0.2(pH 保持中性),則其特性粘度下降两倍。这表示分子有柔韌性,但下降程度不大,此点很难理解,尤其是 Hopkins 及 Sinsheimer^[99] 前此曾报告烟草斑紋病毒 RNA 在离子强度为零时是棒状构形。离子强度对大肠杆菌 RNA 的粘度則有較大的影响,离子强度从零增至 0.2 时,特性粘度下降 60 倍^[101]。因此不同来源的 RNA 在結構上也可能有不同之处。

RNA 的粘度也依温度而改变。Boedtker^[100] 将烟草斑紋病毒 RNA 从 6°C 增至 25°C 时,发现粘度增加 50%,但改变是可逆的,与此观察相符合,光散射測定显示分子因温度的增加而舒张,如表 8 所示。这說明温度增加时分子发生可逆地氢鍵的断裂,使結構舒张。

RNA 的流动双折射是强正号的。增加离子强度則流动双折射下降^[101],在 0.1 M 以上 NaCl 中,流动双折射变为弱負值。这与 DNA 相反, DNA 具有强負值的流动双折射。

表 8 温度增加时 TMV RNA 分子的膨胀

T(°C)	$M_w(\times 10^{-6})$	均 方 半 径	η_{sp}/c
开 始 6	2.0	306 Å	0.725
25	1.9	375 Å	1.10
恢复至 6	1.9	326 Å	0.82

溶剂是磷酸緩冲液 0.06 离子强度, pH 8.5。

一切經過研究的 RNA 都有高度的低色性。低色性依温度而改变。温度升高則低色性降低,但影响是比較徐緩而不是突然的。轉变温度的高低与 RNA 的化学成分有关,鳥便嘌呤含量增加时則轉变温度升高^[65],但有一点与 DNA 不同,即在温度升高时所引起的紫外吸收的增加是完全可逆的。

天然 RNA 在低温有較高的比旋度(右旋)。在 20°C,烟草斑

紋病毒的 RNA 的比旋度約为 $+190^{\circ}$ ^[65]，但在 80°C 則降至接近零。温度对比旋度的影响和对低色性的影响是平行的^[65]。

Doty 及其同工认为这說明 RNA 分子中有多数不完整的螺旋区，温度上升至一定程度时螺旋結構轉变为无規綫团結構。

根据温度对 RNA 的低色性和比旋度的影响，Doty 等^[65] 提出一个估計 RNA 螺旋程度的方法。假定合成的多腺核苷酸和多尿核苷酸的复合体(Poly A + U) 在低温的螺旋程度为 100%，加温至一定程度可以使螺旋程度降至零，比較 Poly A + U 和天然 RNA 在低温及高温間的低色性或比旋度就可以估計出天然样品的螺旋程度。使用此法，Boedtker^[102] 估計烟草斑紋病毒 RNA 的螺旋程度是 60%。

Timasheff 等^[103] 以 Luzzati 氏的絕對小角度 X 綫技术研究了 RNA，发现在稀盐溶液中 RNA 分子具有短的刚性棒結構，其单位长度的质量和厚度和 DNA 的相似。棒狀結構虽对蒸餾水透析数小时后仍保持不变。棒狀結構占 RNA 总质量的 90%，此数值較 Doty 的估計高很多。

总之，对 RNA 的結構还不够了解。初步可以认为 RNA 具有較 DNA 柔韌的結構，具有部分螺旋区，螺旋的规律性也較 DNA 为低，螺旋是双鏈組成抑或单鏈反折組成，还不清楚。

(四) Doty 等关于核糖核酸二級結構的“成环”假說 最近 Doty 等^[104] 对 RNA 的二級結構提出一个所謂“成环”假說。根据他們过去的工作，証明 RNA 具有部分螺旋区(40~60%)。但是有两个問題未能得到解决，一是占有大約半数的碱基是如何适当納入这些螺旋区的；二是螺旋区的长短如何。关于这方面的問題，他們从以下的研究得到启发。

Fresco 及 Albert^[105] 发现含有一些杂乱排列的尿核苷酸的多聚腺核苷酸鏈仍然可以和多聚尿核苷酸鏈結合成双鏈螺旋。同样，含有一些腺核苷酸的多聚尿核苷酸鏈也可以和多聚腺核苷酸鏈相結合，形成双螺旋結構，因此他們推測在形成螺旋时，不能成对的碱基可能形成“环”而被排出于螺旋之外。

据此 Doty 等^[104] 认为天然 RNA 也有同样情况。如果有成环作用, 则碱基间可能形成的氢键数目将大为增加, 例如 22 个任意排列的核苷酸组成的多核苷酸最多只能形成三个氢键, 平均为两个, 如果允许成环, 则最多可以形成七个氢键, 平均为 6 个(图 26)。

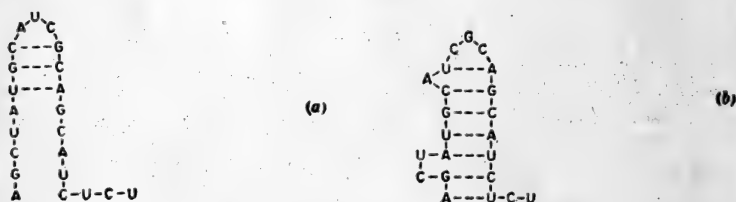


图 26 核糖核酸的成环作用

成环的结果会使螺旋的稳定性下降。这是由于“环”的形成造成负电荷的堆积而增加静电斥力所致。同时, “环”会对邻近的螺旋区造成张力。以 T_m (转变温度范围的平均值) 值为螺旋稳定性的指标, 多聚 AU 及多聚 U 的螺旋(A 代表腺核苷酸, U 代表尿核苷酸), 在成环的核苷酸残基不超过 1/3 时, 能在 25°C 稳定, 在此复合体中只有多聚 AU 键上有环。

在天然 RNA 的情况下, 应当形成螺旋的双股都有环, 这可能使螺旋的稳定性更为降低, 但天然 RNA 具有较强的鸟嘌呤和胞嘧啶间的氢键, 可能补偿上述影响而有余, 因此推测在天然 RNA 中, 即使有 1/3 核苷酸残基形成环, 仍能在 25°C 稳定。

螺旋愈短则 T_m 愈低。Doty 等以长链多聚 U 和不同长度的短链多聚 A 结合, 观察其 T_m , 结果指出当多聚 A 的核苷酸数目为 4 对, T_m 约为 25°C。天然 RNA 由于有鸟-胞键, 可以加强螺旋的稳定程度, 因此推测在 25°C, 如果想保持稳定的螺旋区, 最短应有 4 对核苷酸。

总括起来, Doty 等的假说有下列特征。

1. RNA 是单链分子, 其二级结构是分子内部的相互作用而产生的。

2. 几种可能的二级结构中 DNA 型的双链螺旋最为稳定，鳥-胞对較腺-尿对为强。

3. 在 25°C 和中等离子强度，无环的最短螺旋长度约为 4 对核苷酸。

4. 在以上情况下，假定鳥-胞及腺-尿对的含量相等，則会有 6 个碱基对的螺旋区可以允許有 3 个成环的核苷酸残基（总核苷酸的 $1/5$ ）。更长的螺旋区可以允許有 $1/3$ 的核苷酸突出成环而不致破坏它的稳定性。

5. RNA 由于成环作用而获得最稳定的构型。

6. 螺旋区之間由短的单链連接。

根据以上特征，一个由 90 个核苷酸杂乱組成的多核苷酸鏈可以形成如下的构型(图 27 a 及 b)，其中以 b 型可能性較大，由于

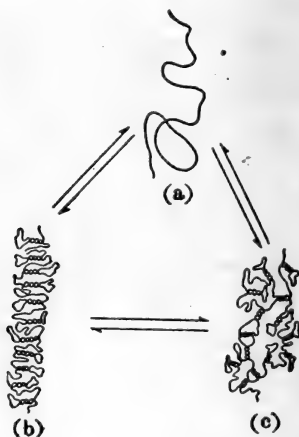


图 28 不同离子强度和温度下高聚 RNA 大分子在溶液中构型及結構的可能轉变

(a) 松散的无規綫团或舒张鏈 (在不含盐或高温情况下); (b) 紧湊的棒, 具有部分排列整齐的螺旋区 (低温、低离子强度情况下); (c) 紧湊綫团, 具有螺旋区 (在低温、高离子强度情况下)。

$a \rightleftharpoons b$ 在不含盐的水溶液中加入盐, 及相反地, 在低温除去盐 (在室温或低于室温); 或将溶液加热 ($b \rightarrow a$) 及相反地, 在低离子强度将溶液冷却。

$b \rightleftharpoons c$ 在低温 (室温或室温以下) 增加或相反地, 降低离子强度。

$c \rightleftharpoons a$ 在高离子强度, 将溶液加温或相反地将热溶液冷却。

它比較穩定,而 a 型中則有較長的不穩定區。

(五) Spirin 对核糖核酸三級結構的看法 Spirin^[10]認為在不同情況下, RNA 可以有不同的結構。

在沒有二價陽離子的水溶液中,或高溫緩衝液中, RNA 的構型是舒張的和伸展的單一核苷酸鏈,或是很松散的無規綫團(圖 28 a)。

在室溫的緩衝液中, RNA 具有一個非常緊湊的卷曲構型,並具有螺旋區。從這一構型轉變為舒張的構型不是逐漸的而是具有“相”的轉變的特徵,或稱之為“融化”。Dvorkin 及 Spirin 的電紫外二色性的測定說明在室溫緩衝液中, RNA 的核鹼平面和分子的長軸平行。因此他們認為短螺旋區是和分子長軸垂直排列的;螺旋區和雜亂區交替堆疊成緊湊的棒(圖 28 b)。

如再增加溶液的離子強度, RNA 大分子有縮短長度的趨勢,同時形成更多的分子內部氫鍵(圖 28 c),結果棒狀的大分子便進一步折疊及卷曲,形成更為卷曲而緊湊的狀態。

三種狀態的相互轉變有如图 28 所示。

參 考 文 獻

- [1] Astbury, W. T. and Bell, F. O., *Nature*, **141**:747, 1938; *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **6**:109, 1938.
- [2] Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**:66, 1947.
- [3] Furberg, S., *Nature*, **164**:22, 1949.
- [4] Furberg, S., *Acta Cryst.*, **3**:325, 1950.
- [5] Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, **6**:634, 1932.
- [6] Pauling, L. & Corey, R. B., *Nature*, **171**:346, 1953.
- [7] Pauling, L. & Corey, R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **39**:84, 1953.
- [8] Gulland, J. M., Jordan, D. O. and Taylor, H. F. W., *J. Chem. Soc.*, p. 1131, 1947.
- [9] Watson, J. D. and Crick, F. H. C., *Nature*, **171**:737, 1953.
- [10] Watson, J. D. and Crick, F. H. C., *Proc. Roy. Soc. A*, **223**:80, 1954.
- [11] Watson, J. D. and Crick, F. H. C., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **18**:123, 1953.
- [12] Wilkins, M. F. H., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **21**:75, 1956.

- [13] Pauling, L. and Corey, R. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**:164, 1956.
- [14] Hall, C. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**:625, 1956.
- [15] Hall, C. E., *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **42**:801, 1956.
- [16] Hall, C. E. and Litt, M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**:1, 1958.
- [17] Hall, C. E. and Doty, P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**:1269, 1958.
- [18] Doty, P., McGill, B. B. and Rice, S. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **44**:432, 1958.
- [19] Peacocke, A. R. and Schachman, H. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **15**:198, 1954.
- [20] Coates, J. H. and Jordan, D. O., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**:309, 1959.
- [21] Oth, A., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **64**:434, 1955.
- [22] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V., *Nature*, **175**:500, 1955.
- [23] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V., *Trans. Faraday Soc.*, **52**:734, 1956.
- [24] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V., *J. Polym. Sci.*, **23**:705, 1957.
- [25] Shooter, K. V., *Progr. Biophys.*, **8**:309, 1957.
- [26] Stern, K. G. and Atlas, S. M., *J. Biol. Chem.*, **203**:795, 1953.
- [27] Kahler, H. J. and Shack, J., *J. Phys. Chem.*, **61**:649, 1957.
- [28] James, D. W. F., Thesis, University of London, 1954.
- [29] Coates, J. H., Thesis, University of Adelaide, 1957.
- [30] Doty, P. and Bunce, B. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**:5029, 1952.
- [31] Sadron, C., Pouyet, J. and Vendrely, R., *Nature*, **179**:263, 1957.
- [32] Reichmann, M. E., Rice, S. A., Thomas, C. A. and Doty, P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**:3047, 1954.
- [33] Cavalieri, L. F., Rosoff, M. and Rosenberg, B. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**:5239, 1956.
- [34] Butler, J., *Proc. Fourth Int. Congress of Biochemistry, Vienna, Vol. IX*, 1958.
- [35] Signer, R., Caspersson, T. and Hammarsten, E., *Nature*, **141**:122, 1938.
- [36] Tennent, H. G. and Vilbrandt, C. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**:424, 1943.
- [37] Cecil, R. and Ogston, A. G., *J. Chem. Soc.*, p. 1382, 1948.
- [38] Kahler, H. J., *J. Phys. Chem.*, **52**:676, 1948.
- [39] Mathieson, A. R. and Matty, S., *J. Polym. Sci.*, **23**:747, 1957.
- [40] Goldstein, M. and Reichmann, M. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**:3337, 1954.
- [41] Rowen, J. W. and Norman, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**:524, 1954.

- [42] Brown, G. L., M'Ewen, M. B. and Platt, M. I. *Nature*, **176**:161, 1955.
- [43] Alexander, P. and Stacey, K. A., *Biochem. J.*, **60**:194, 1955.
- [44] Pouyet, J., Hermans, J. and Vendrely, R., *Trans. Faraday Soc.*, **53**:247, 1957.
- [45] Potuyet, J. and Weill, G., *J. Polym. Sci.*, **23**:739, 1957.
- [46] Doty, P., *Proc. 3rd Intern. Congress Biochemistry, Brussels* p. 135, 1955.
- [47] Rowen, J. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **10**:391, 1953.
- [48] Flory, P. J. and Fox, T. G., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**:1904, 1951.
- [49] Doty, P., McGill, B. and Rice, S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**:432, 1958.
- [50] Jordan, D. O. and Porter, M. R., *Trans. Faraday Soc.*, **50**:301, 1954.
- [51] Simha, R., *J. Phys. Chem.*, **44**:25, 1940.
- [52] Geiduschek, E. P., Thesis, University of Harvard, 1951.
- [53] Thomas, R., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**:231, 1954.
- [54] Cavalieri, L. F. and Stone, A. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**:4699, 1955.
- [55] Cox, R. A. and Peacocke, A. R., *J. Polym. Sci.*, **23**:765, 1957.
- [56] Peacocke, A. R., Special Publication, No. 8, The Chemical Society, London, 1957.
- [57] Peacocke, A. R. and Preston, B. N., *J. Polym. Sci.*, **31**:1, 1958.
- [58] Cavalieri, L. F. and Rosenberg, B. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**:5352, 1957.
- [59] Reichmann, M. E., Bunce, B. H. and Doty, P., *J. Polym. Sci.*, **10**:109, 1953.
- [60] Alexander, P. and Stacey, K. A., *Biochem. J.*, **60**:194, 1955.
- [61] Ehrlich, P. and Doty, P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**:4251, 1958.
- [62] Doty, P., *J. Cell Comp. Physiol.*, **49**:27, 1957.
- [63] Geiduschek, E. and Holtzer, A., *Advances in Biological and Medical Physics*, **6**:431, 1958.
- [64] Rice, S. A. and Doty, P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**:3937, 1957.
- [65] Doty, P., Boedtker, H., Fresco, J., Haselkorn, R. and Litt, M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**:482, 1959.
- [66] Marmur, J. and Doty, P., *Nature*, **183**:1427, 1959.
- [67] Zamenhof, S., Griboff, G. and Marullo, N., *Biochim. Biophys. Acta*, **13**:459, 1954.
- [68] Conway, B. E., *J. Polym. Sci.*, **20**:299, 1956.
- [69] Mathieson, A. R. and Porter, M. R., *J. Chem. Soc.* p. 1298, 1958.
- [70] Gibbs, J. H. and DiMarzio, E. A., *J. Chem. Phys.*, **30**:271, 1959.
- [71] Zimm, B. H., *J. Chem. Phys.*, **33**:1349, 1960.
- [72] Helmkamp, G. K. and Ts'o, P. O. P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**:138,

1961: *Tetrahedron*, **13**:198, 1961.

- [73] Herskovits, T. T., Singer, S. J. and Geiduschek, E. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**:99, 1961.
- [74] Lerman, L. S., *J. Mol. Biol.*, **3**:18, 1961.
- [75] Luzzati, V., Masson, F. and Lerman, L. S., *J. Mol. Biol.*, **3**:634, 1961.
- [76] Doty, P. and Rice, S. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **16**:446, 1955.
- [77] Cox, R. A. and Peacocke, A. R., *J. Chem. Soc.*, 2646, 1956.
- [78] Cox, R. A. and Peacocke, A. R., *J. Chem. Soc.*, 2499, 1956.
- [79] Thomas, C. A. and Doty, P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**:1854, 1956.
- [80] LaLand, S. G., Lee, W. A., Overend, W. G. and Peacocke, A. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**:356, 1954.
- [81] Goldstein, G. and Stern, K. G., *J. Polym. Sci.*, **5**:687, 1954.
- [82] Dekker, C. A. and Schachman, H. K., *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **40**:894, 1954.
- [83] Kunitz, M., *J. Gen. Physiol.*, **33**:349, 1950.
- [84] Cox, R. A., Overend, W. G., Peacocke, A. R., and Wilson, S., *Nature*, **176**:919, 1955.
- [85] Thomas, C. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**:1862, 1956.
- [86] Rice, A. and Watson, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, **40**:759, 1954.
- [87] Rice, A. and Watson, J. D., *Nature*, **173**:995, 1954.
- [88] Zubay, G. and Wilkins, M. F. H., *J. Mol. Biol.*, **2**:111, 1960.
- [89] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Williams, R. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **25**:87, 1957.
- [90] Gierer, A. and Schramm, G., *Nature*, **177**:702, 1956.
- [91] Cheo, P. C., Friesen, B. S. and Sinsheimer, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, **45**:305, 1959.
- [92] Cox, R. A., Jones, A. S., Marsh, G. E. and Peacocke, A. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**:576, 1956.
- [93] Kawade, Y. and Kitamura, T., *Proc. Seventh Symp. Nucleic Acids, Nagoya, Japan*, p. 5, 1958.
- [94] Grinnan, E. L. and Mosher, W. A., *J. Biol. Chem.*, **191**:719, 1951.
- [95] Cohen, S. S. and Stanley, W. M., *J. Biol. Chem.*, **144**:589, 1942.
- [96] Schramm, G. and Gierer, A., *Special Publication N. Y. Acad. Sci.*, **5**:231, 1957.
- [97] Northrop, G. and Sinsheimer, R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **17**:476, 1955.
- [98] Timasheff, S., Brown, R., Colter, J. and Davies, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **27**:662, 1958,

- [99] Hopkins, G. R. and Sinsheimer, R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, 17: 476, 1955.
- [100] Boedtker, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 32:519, 1959.
- [101] Littauer, U. and Eisenberg, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 32:320, 1959.
- [102] Boedtker, H., *J. Mol. Biol.*, 2:171, 1960.
- [103] Timasheff, S. N., Witz, J. and Luzzati, V., *Biophys. J.*, 1:525, 1961.
- [104] Fresco, J. R., Alberts, B. M. and Doty, P., *Nature*, 188:98, 1960.
- [105] Fresco, J. R. and Alberts, B. M., *Proc. Nat. Acad. Sci, Wash*, 46: 311, 1960.
- [106] Spirin, A. S., *J. Mol. Biol.*, 2:436, 1960,

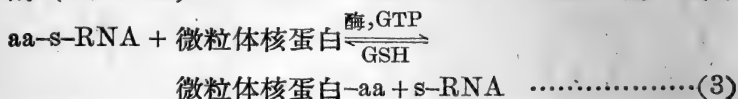
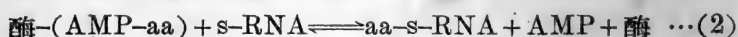
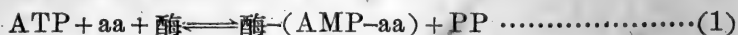
第四讲 可溶性核糖核酸

吳冠芸

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、核酸和蛋白质生物合成的关系^[6,33,34,35,37,53,61]

近年来,用部分純化的无細胞制剂进行氨基酸并合作用的研究,使核酸和蛋白质生物合成的关系,得到了比較合理的假設。一般认为蛋白质的合成过程可以分为几个阶段:首先是氨基酸在氨基酸激活酶的存在下被激活,生成了氨基酸腺苷酸酐,后者与可溶性核糖核酸(s-RNA)作用生成氨基酸-s-RNA并释出腺苷酸。然后,氨基酸在酶的作用下又从s-RNA被运送到微粒体核蛋白上,并以一定的位置排列起来成为肽鏈。最后蛋白质从微体释出。这些过程可以简单的表示如下*:



* 本文采用下列简写字:

RNA—核糖核酸;

pU—尿嘧啶核苷酸;

s-RNA—可溶性核糖核酸;

pG—鳥便嘌呤核苷酸;

ATP—腺嘌呤核苷三磷酸;

pT—胸腺嘧啶核苷酸;

GTP—鳥便嘌呤核苷三磷酸;

PP—焦磷酸;

CTP—胞嘧啶核苷三磷酸;

aa—氨基酸;

AMP 或 pA—腺嘌呤核苷酸;

GSH—还原型谷胱甘肽。

CMP 或 pC—胞嘧啶核苷酸;

从上述的过程看来，(2)及(3)两个步骤都需有核糖核酸的参加，在第二个步骤中把激活了的氨基酸运送到微粒体核蛋白时必须依赖于可溶性核糖核酸。本讲就可溶性核糖核酸的理化性质、制备方法、作用机制作一简单的介绍。

二、可溶性核糖核酸的存在及其制备方法

可溶性核糖核酸(s-RNA)^[37]或称细胞汁核糖核酸(cell-sap RNA)，是指组织匀浆经 100,000 g 超速离心数小时后，不被沉淀的低分子核糖核酸。它在盐溶液中的溶解度比微粒体核糖核酸要大得多。细胞中 s-RNA 的含量约为核糖核酸总量的 10~20%。它具有接受氨基酸和运送氨基酸到微粒体核蛋白的能力，所以又被称为“接受”核糖核酸(acceptor RNA)，或转运核糖核酸(transfer RNA)^[64]。

s-RNA 自 1957 年由 Hoagland 发现以后，到现在只有几年的时间，已经成为生物化学家研究的中心问题之一。也有了较全面的综述，是值得参考的^[84]。很多工作者研究了不同生物、不同组织中 s-RNA 的本质、特性以及氨基酸-s-RNA 化合物的反应。如在动物中研究过的有大鼠^[10,31,36~38,43,55,56,79]、小牛^[31]、豚鼠^[47,64,66]、兔^[68]及猪^[76]的肝脏、豚鼠乳腺^[21,22,26]、艾氏腹水癌细胞^[30,31,38]、鸽胰脏^[78]及红细胞。细菌中研究得最广泛的系统是大肠杆菌^[8,9,14,50,54,60,75]、酵母^[51,57,58,76]。此外关于豌豆种子的 s-RNA 性质也已有报导^[76]。

s-RNA 生物活力的测定，一般是将所需测定的 s-RNA 样品与标记氨基酸、氨基酸激活酶、ATP、 Mg^{++} 一起保温，然后测量 RNA 的放射活性。

s-RNA 的制备方法大约可分为两类。

(一) 超速离心法 主要是利用 s-RNA 在长时间超速离心(100,000 g, 3~5 小时)下不被沉淀的特性而与微粒体的核蛋白分离。组织匀浆经 3~5 小时 100,000 g 离心后，s-RNA 保留于上清液中，用酚抽提以除去其蛋白，分出水层，加入酒精，s-RNA

即可沉淀得到。Hoagland^[36]最初就是用这样的方法分离了鼠肝的 s-RNA。Osawa^[57]将酵母用石英砂磨碎, 6000 g 离心 2 分钟, 取出混浊液, 再在 78,410 g 下离心两小时, 用 90% 酚处理得到的上清液, 抽出水层, 加入酒精以沉淀 s-RNA。此粗制品再以 Ecteola-纖維素树脂进一步純化, 可以得到电泳及超速离心图谱上均一的酵母 s-RNA。Tissieres^[75]及 Brown^[14]相继用超速离心法分离了大肠杆菌的 s-RNA, 经过反复純化的产物在电泳及超速离心中也都呈匀一的图谱。

(二) 整細胞法 不經超速离心, 直接将組織用酚或去污剂处理, 这样用酒精沉淀得到的 RNA 往往是不匀一的, 必需用其他方法除去其中含有的大分子。例如 Brown^[62]将鼠肝直接在酚溶液中磨碎, 抽提得到的 RNA 在超速离心图谱上呈四个峰, 經 1 M 盐分步沉淀, 除去其中的大分子 RNA, 制得的 s-RNA 在超速离心图谱上虽不匀一, 但活性較超速离心法制得的为高。Zamecnik 等^[51]用酚溶液直接处理酵母, 以酒精沉淀得到的 RNA, 再經碳粉处理等純化步骤, 也能制得超速离心图谱上匀一的 s-RNA。Ofengand 等^[54]报告以热的去污剂抽提大肠杆菌的 s-RNA, 然后用盐、Ecteola-纖維素树脂进一步提純, 可以大量的制备 s-RNA。

三、可溶性核糖核酸的理化性质与組成

用上述方法制得的 s-RNA 尚含有少量的多糖、蛋白质、脫氧核糖核酸等杂质。不同来源的 s-RNA 其分子量均在 25,000~30,000, 与从測定末端而算出的結果, 即 s-RNA 鏈是由 75~100 个核苷酸^[1,14,19,36,45,51,54,57,68,75]构成的极为一致, 也有个别报告 s-RNA 鏈长为 40~60 个核苷酸的^[32,83]。在稀盐溶液中測得的 s-RNA 克原子磷消光系数(ϵ_P) 在 7×10^3 左右, 其 ϵ_P 随温度的升高或盐浓度的降低而增加, 也呈低色性, 如图 1 所示。

事实表明了 (1) s-RNA 和其他类型的 RNA 一样, 具有大量氢鍵結合的碱基对, 形成一定的螺旋区。从保温过程中 $\epsilon_{P_{260}}$ 变化的幅度, 可以計算出 s-RNA 中形成氢鍵的碱基对占 40% 左

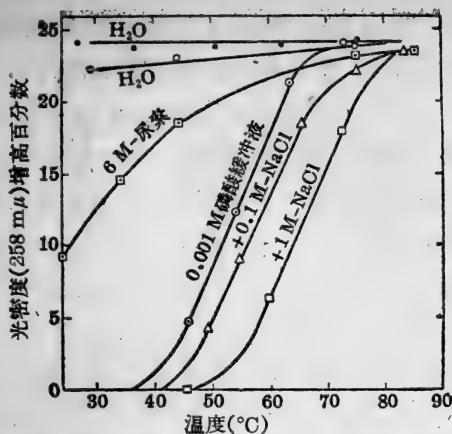


图1 温度和盐浓度对大肠杆菌 s-RNA 光密度(258 mμ)的影响

右^[6,13,23,75]。(2)s-RNA 鏈具有一定的柔性,在 6 M 脲溶液和蒸餾水中呈伸展状态,在盐溶液中加热引起的变化在冷却时可恢复 95~100%,可逆性极大^[75]。

s-RNA 的粘度也受盐浓度的影响,虽然其变化不如高分子 RNA 那样大。例如,酵母高分子 RNA 在水中测得的 $[\eta]$ 是盐溶液(0.1 N NaCl-0.03 Tris)中的 22 倍,而 s-RNA 为 3.8 倍^[57]。这一个现象也说明了 s-RNA 具有一定的柔性,在盐浓度增加时,分子可以卷曲而粘度下降。

s-RNA 的其他一些物化常数,归纳成表 1。

表1 s-RNA 的理化性质^[84]

	沉降常数 S_{20} $10^{13} (\text{cm}^2/\text{sec}) /$ 单位力场	粘 度 $[\eta]$ $\text{g}/\text{cm}^3/\text{sec}$	扩散系数 D $10^7 (\text{cm}^2/\text{sec})$	旋光度 $[\alpha]_D$	分 子 量	参考文献
大肠杆菌	4.0	0.075	7.84	+160	2.6×10^3	[75]
大肠杆菌	4.6	—	9.25	—	3.5×10^3	[83]
大肠杆菌	2.55~2.95*	—	7.6	—	2.45×10^3	[14]
大肠杆菌	3.75~4.05	—	—	—	—	[59]
腊状杆菌	4.0	—	—	—	—	[57]
酵 母	4.0	0.05~0.07	—	+148	$2.3-2.7 \times 10^3$	[69]
兔 肝	4.0	—	—	—	—	[12]
大 鼠 肝	4.0~4.08	—	—	—	—	[36]
腹水癌细胞	1.85	—	—	—	—	[44]
豆 胚	4.0	—	—	—	—	

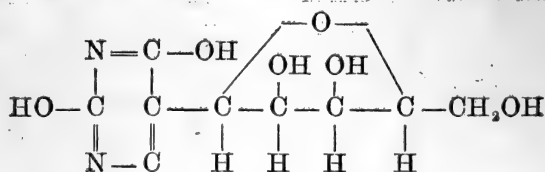
* 带有氨基酸的 s-RNA。

从现有的材料看来, 动物与细菌 s-RNA 的碱基组成没有很大差别(表 2), 与微粒体 RNA 的情况颇不相同。

表 2 可溶性 s-RNA 的碱基组成

来 源	腺 嘌 呤	鳥 便 嘌 呤	胞 嘧 啶	尿 嘧 啶	非平常碱基	参考文献
大肠杆菌	10	17.2	15.5	8.1	15	[71]
大肠杆菌	10	15.8	14.5	8.8	—	[7]
大肠杆菌	10	17.4	14.8	8.7	—	[11]
大肠杆菌	10	15.2	14	9.2	0.6	[50]
	10	14.7	13.4	9.3	—	[77]
酵 母	10	15.2	11.7	11.1	2.74	[57]
酵 母	10	15.8	15.3	10.8	2.56	[51]
大 鼠 肝	10	17.4	15.4	10.2	—	[48]
	10	15.4	9.6	6.7	—	[26]
	10	15.8	17.1	8.8	1.3	[32]
豚 鼠 肝	10	18.3	16.7	11.1	4	[65]
腹 水 癌	10	18.2	13.4	9.6	—	[24]
兔 肝	10	18	17	10	2	[68]

此外, s-RNA 分子中一些不常见的组成, 如甲基化了的碱基, 拟尿嘧啶核苷, 相对含量很高。Dunn^[19]分析了大鼠肝微粒体



拟尿嘧啶核苷的结构式

与可溶部分核糖核酸的不常见组成, 见表 3。

表3 大鼠肝微粒体与可溶部分核糖核酸中不常见组成的相对含量

组 成	克分子/100 克分子尿嘧啶核苷	
	微粒 RNA	可溶性 RNA
拟尿嘧啶核苷	7.5	25
5-甲基胞嘧啶	0.4	10
6-甲基嘌呤	0.5	8.1
6-二甲基嘌呤	0.1	0.1
1-甲基鸟嘌呤	0.1	3.3
2-甲基 6-羟基嘌呤	0.1	2.3
2-二甲基 6-羟基嘌呤	0.1	3.0

Osawa^[58] 测定了酵母细胞内各个不同部分的核苷酸组成和 C¹⁴-亮氨酸的并合作用。发现拟尿嘧啶核苷酸的含量与氨基酸并合作用有密切关系。从 105,000 g 离心后的上清液中制得的 RNA，拟尿嘧啶核苷酸含量最高，并合作用也最旺盛。如果以腺嘌呤核苷酸的含量作为 10 克分子，则拟尿嘧啶核苷酸含量：从 10,000 g 沉淀（称为大颗粒部分）制得的 RNA < 0.1 克分子；

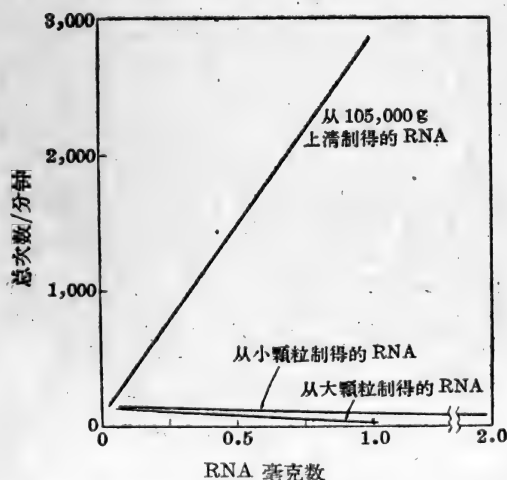


图2 酵母细胞不同部分制得的 RNA, L-C¹⁴-亮氨酸并合作用能力的比较^[58]。

105,000 g 沉淀(称为小颗粒部分)制得的 RNA < 0.3 克分子,而 105,000 g 上清液部分制得的 RNA 为 1.4 克分子。不同部分 C^{14} -亮氨酸并合作用能力的比较见图 2。作者为了进一步肯定上述结果,将 105,000 g 上清液调至 pH 5 或 pH 5.3,又分成上清与沉淀两部分,并分别测定了它们的核苷酸组成及 C^{14} -亮氨酸的并合作用。实验结果表明氨基酸并合作用的能力与拟尿嘧啶核苷酸的含量成正比。而且发现拟尿嘧啶核苷酸与尿嘧啶核苷酸之和在 RNA 制剂中几乎为一常数。具有氨基酸并合活力的 RNA 中拟尿嘧啶核苷酸含量增加而尿嘧啶核苷酸含量则减少(表 4)。作者由此推论拟尿嘧啶核苷酸是具有氨基酸并合活力 RNA 的特殊组成,其分子中部分尿嘧啶核苷酸被拟尿嘧啶核苷酸所代替。

表 4 从 105,000 g 上清液各部分制得的核糖核酸的核苷酸组成及其 C^{14} -亮氨酸的并合作用^[58]

RNA 来源	核苷酸组成 克分子/100 克分子核苷酸						与 RNA 联结的 C^{14} -亮氨酸量(3) 毫微克分子/ 1 毫克 RNA	(3) (2)
	腺核 苷酸	鸟便核 苷酸	胞核 苷酸	(1) 尿核 苷酸	(2) 拟尿核 苷酸	(1) + (2)		
实验 1								
pH5.0 上清	21.2	27.2	25.2	21.8	4.66	26.46	1.68	0.366
pH5.0 沉淀	23.9	27.4	22.0	24.4	2.38	26.78	0.92	0.367
实验 2								
未经部分分 离的上清	21.1	28.3	24.4	22.1	4.45	27.55	1.68	0.368
pH5.0 上清	20.8	27.2	24.3	22.2	5.57	27.77	2.01	0.361
pH5.3 上清	20.7	28.0	24.6	20.9	5.74	26.64	2.03	0.354
pH5.0 沉淀	24.8	28.9	19.5	25.5	1.32	26.82	0.47	0.356
pH5.3 沉淀	25.5	30.3	17.5	25.9	< 0.50	26.40	0.00	—
小 颗 粒	25.6	29.0	18.6	26.8	< 0.10	26.90	0.00	—

四、可溶性核糖核酸的均一性、 特异性及其提取

目前很多工作者认为每一个氨基酸需要一个特殊的激活酶,也需要一个特殊的 s-RNA,因此有 20 种氨基酸,至少也有 20 种

s-RNA。所以从一般方法制得的 s-RNA,即使在超速离心及电泳图谱上表现均一的制剂也还是各种不同 s-RNA 的混合物。这样一个看法有以下两个主要根据:第一,从 C^{14} -氨基酸并合作用的实验结果,知道各个氨基酸与 s-RNA 相结合的量是加起来的而不是相互干扰的。例如某种 s-RNA 能分别与 x 量的甲氨基酸结合, y 量的乙氨基酸结合,在反应时如同时放入这两种氨基酸,则 s-RNA 能结合氨基酸的量是两者的和。第二,很多实验室已经部分分离了特异性的 s-RNA。

由于 s-RNA 的分子量对核酸来说比较小,而且又具有较易测定的活力指标,因此很多实验室企图进一步分离出只能与某一个氨基酸相联结的 s-RNA,来解决它的结构及其结构与功能之间的关系。但是由于各个 s-RNA 彼此大小形状和所带电荷相差不多,所以还没有满意地达到完全分离的目的。分离的方法可以分成下列三类:

(一) 逆流分溶法 Holly^[41] 最初用 2 M pH 8 的磷酸缓冲液,异丙醇和甲酰氨为溶剂分离鼠肝的 s-RNA,经过 250 次转移之后,丙氨酸 s-RNA 和酪氨酸 s-RNA 可以分开,两者高峰相差 25 管。由于 pH 8 可以引起核酸的徐缓水解,有失却活力的现象,因此分离得到的 s-RNA 活力较原样品只增加两倍,总活力回收率仅 40%。后来 Holley^[40] 改用 pH 6 (1.9 M) 的磷酸缓冲液并加入 $MgCl_2$ 以增加 s-RNA 的稳定性。鼠肝的 s-RNA 经过 200 次转移后,苏氨酸与酪氨酸的 s-RNA 可以分开。两者高峰相差 40 管,总活力回收率为 80%,酪氨酸 s-RNA 活力增加 6 倍。但苏氨酸与缬氨酸、亮氨酸与酪氨酸的 s-RNA 彼此不能完全分开。用同样的溶剂 Holly^[39] 分离了酵母的酪氨酸与缬氨酸的 s-RNA。酵母 s-RNA 经过 6 次转移,缬氨酸 s-RNA 提高活力 $2\frac{1}{2}$ 倍,酪氨酸 s-RNA 提高活力 2 倍。酵母 s-RNA 经过 400 次^[17] 转移后可将接受丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、酪氨酸、色氨酸的 RNA 全部或部分分开。缬氨酸与酪氨酸 s-RNA 的活力增加 10 倍。Holly^[3] 也采用磷酸缓冲液 (pH 7.5)、2-乙氧基乙醇、2-丁氧基

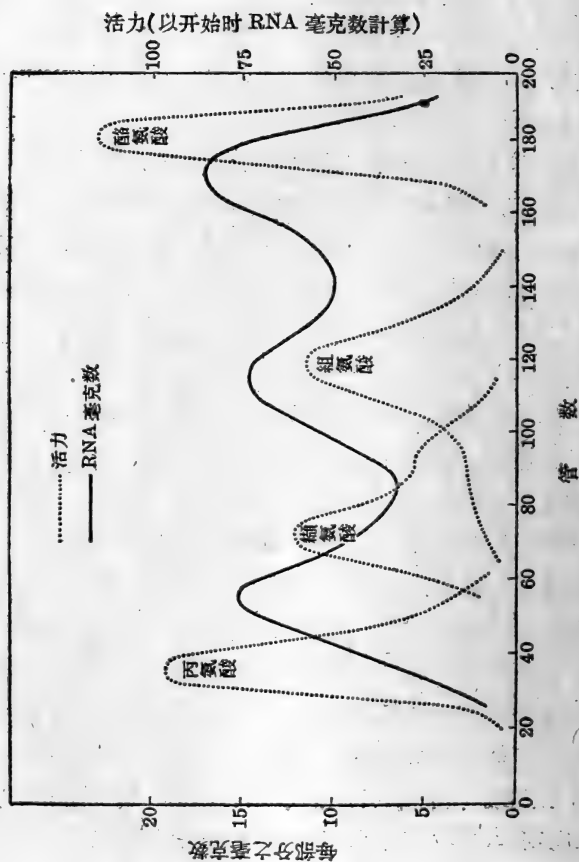


图3 酵母 s-RNA 經 200 次轉移后的逆流分溶图谱 (pH 6, 甲酰胺溶剂系统)^[4]

乙醇及 N, N-二丁基乙醇为溶剂分离酵母 s-RNA, 经过 200 次转移后的图谱和甲酰胺溶剂系统分离的图谱相似。最近 Holley^[4] 报告用上述甲酰胺溶剂系统, 将酵母酪氨酸-, 组氨酸-, 丙氨酸-, 缬氨酸-, s-RNA, 全部或部分分开后 (图 3), 分别再用逆流分溶法反复提纯, 丙氨酸-, 缬氨酸-, 酪氨酸-s-RNA 的最纯部分, 纯度达 60%, 可供研究结构之用。

(二) 柱层离法

1. Smith 等^[70] 用阳离子交换淀粉 Cato-8 柱吸附豚鼠肝脏的 s-RNA, 然后用不同浓度 NaCl 洗脱, 可将亮氨酸 s-RNA 与酪氨酸-s-RNA 分开。在未分离前接受亮氨酸和酪氨酸的活力比率为 3.8/1, 0.125 M NaCl 洗下的 s-RNA 部分, 亮氨酸与酪氨酸的活力比降至 1.1/1, 而 1.0 M NaCl 洗下的部分, 亮氨酸与酪氨酸活力比增至 30/1。

2. Hartman 和 Coy^[82] 以磷酸钙作为吸附剂, 以不同浓度的磷酸缓冲液洗脱, 可将缬氨酸 s-RNA 与苯丙氨酸 s-RNA 分开, 接受缬氨酸的活力提高 11 倍。

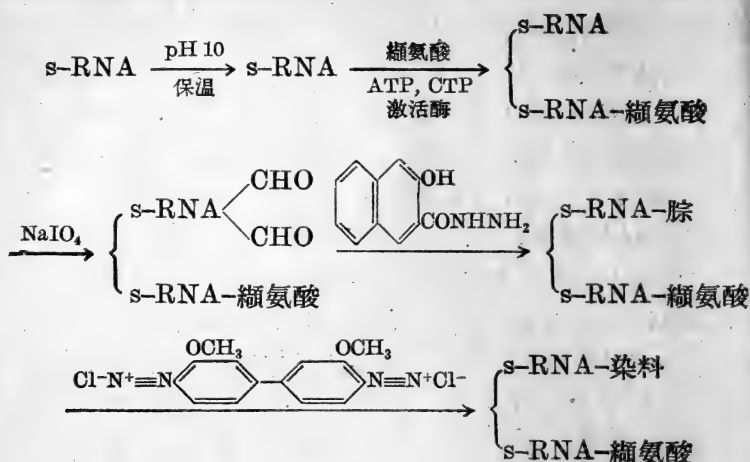
3. Takanami^[74] 用 DEAE 纤维素树脂分离了 C^{14} -亮氨酸 s-RNA。他首先将鼠肝的 pH 5 部分与亮氨酸及 ATP 一起保温, 使接受亮氨酸的 s-RNA 与 C^{14} -亮氨酸结合。然后用酚液抽提, 得到的 s-RNA 再经 DEAE-纤维素树脂吸附, 以 LiCl 为洗脱剂, 用梯度洗脱法可以分离出接受亮氨酸的 s-RNA。

4. Everett 等^[20] 用硅酸柱进行分配层析, 分离了下面几种 s-RNA, 并得到了不同倍数的提纯: 酪氨酸 9 倍, 色氨酸 4 倍, 组氨酸 2 倍, 缬氨酸 4 倍, 丙氨酸 5 倍。

(三) 化学方法 由于各个氨基酸的 s-RNA 之间彼此分子量近似, 分子量又大。因此按其分子大小、电荷、溶解度及各核碱的含量不同而加以分离是有困难的。所以有些工作者企图用化学方法加以纯化。

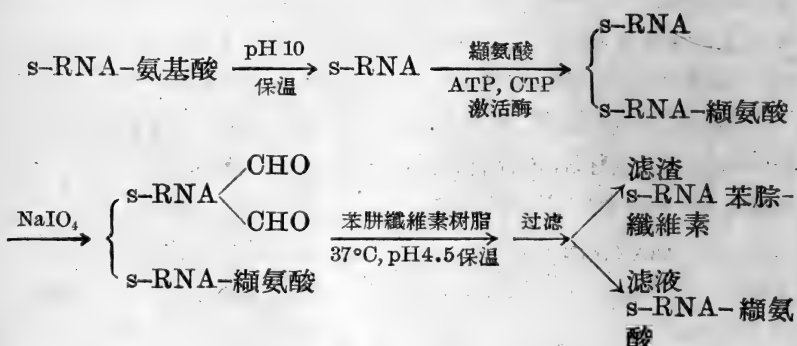
1. Zamecnik^[81] 利用 s-RNA 末端能被过碘酸氧化, 而一旦与氨基酸相连就不再被氧化的原理来分离特异的 s-RNA, 其分离

步骤可以简单的表示如下：



s-RNA-染料与 s-RNA-缬氨酸则可利用其溶解度的不同而加以分离。作者用上法将缬氨酸-与亮氨酸-s-RNA 活力分别提高了 12 倍及 9 倍。

2. Saponara 及 Boch^[69] 利用与上法相同的原理将不带氨基酸的 s-RNA 用过碘酸氧化生成醛基，然后用苯肼纤维素树脂吸附除去，以与带有氨基酸的 s-RNA 分离。其步骤如下：



3. Brown^[13] 利用重氮化聚苯乙烯树脂能和组氨酸和酪氨酸结合的原理，可将组氨酸-和酪氨酸-s-RNA 从各种氨基酸的 s-RNA 混合物中分离出来。然后调节至 pH 10 以除去氨基酸，再

和酪氨酸，ATP，激活酶一起保温。用重氮化聚苯乙烯树脂除去酪氨酸-s-RNA，组氨酸-s-RNA留在上清液内，比活力增加10倍(图4)。

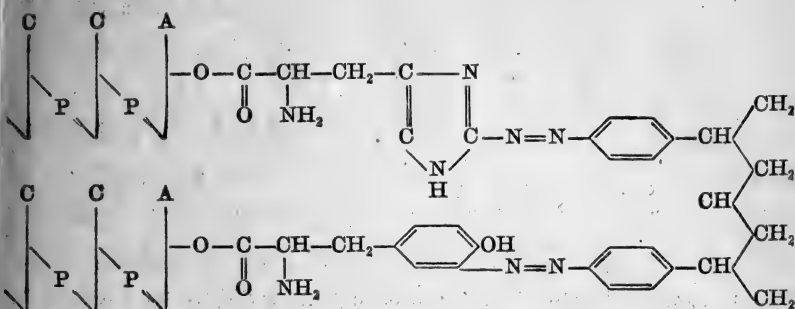


图4 酪氨酸、组氨酸-s-RNA 与重氮化聚苯乙烯的联结方式

最近有些工作者将上述三类方法联合应用，得到较良好的分离效果。Zacheu等^[80]初步报告，以正丁醇-H₂O-三丁基胺-醋酸-二正丁醚(100:130:10:25:24~29)为溶剂，将酵母s-RNA用逆流分溶法分离。然后将此部分纯化了的s-RNA，在鼠肝氨基酸激活酶的存在下，接上所需的氨基酸，没有接上氨基酸的s-RNA用过碘酸氧化。最后用聚丙烯酸苯胍树脂(Lewatit 5082S)进行柱层离。得到的丝氨酸s-RNA，分子量为30,000，纯度达87%。

Zamecnik等^[79]报告用形成s-RNA-染料的化学方法将缬氨酸-s-RNA部分纯化后，再以DEAE-右旋糖酐凝胶(DEAE-Sephadex)柱进一步分离，得到的缬氨酸-s-RNA纯度也可达到66~80%。作者报告个别样品纯度可达90~100%。

虽然进行了各种各样的尝试，但是还未能完全成功地分离出只能和一种氨基酸结合的纯粹的s-RNA。而且从以下的一些事实看来，即使是对某一个氨基酸具有特异性的s-RNA，还存在着不止一种的可能性。首先从上述Holley^[17]得到的逆流分溶图谱可以看到对亮氨酸特异的s-RNA呈两个峰，表明它仍是不均一的。

Goldthwait^[25]报告用Eceteola-纤维素树脂，可以将鼠肝的s-RNA分成两个均具有接受亮氨酸能力的部分，但其接受程度是

不相同的。

Bosch^[10]将鼠肝的 pH 5 部分与 C^{14} -亮氨酸保温,然后进行淀粉电泳,发现电泳图谱上放射性分布范围相当广泛。相反,当激活酶先与 s-RNA 分离,再保温时,在图谱上放射性便只在一个很狭的部分出现。这个事实也表明了具有接受亮氨酸能力的 s-RNA 不是单一的。

此外 Berg 等^[7]报告,高度纯化了了的酵母或大肠杆菌甲硫氨酸激活酶均具有促进氨基酸与大肠杆菌 s-RNA 结合的能力。但是酵母甲硫氨酸激活酶的能力只有大肠杆菌的三分之一。他们的解释,认为大肠杆菌中能接受甲硫氨酸的 s-RNA 至少有两种,酵母的甲硫氨酸激活酶只能促进甲硫氨酸与其中的一种 s-RNA 结合,而大肠杆菌的激活酶能够促进甲硫氨酸与两种 s-RNA 结合。

所以目前初步形成了这样一种看法,就是一种 s-RNA 只能接受一种氨基酸,而一种氨基酸可以与一种以上的 s-RNA 结合。

五、可溶性核糖核酸的结构与功能的关系

(一) 可溶性核糖核酸的末端结构与其接受氨基酸能力的关系 至目前研究过的 s-RNA 不论来源如何,与氨基酸结合的一端,其末端核苷酸均为 CMP—CMP—AMP(图 5),具有这样的末端结构才有接受氨基酸的能力;但其末端的 pCpCpA 在沒有 ATP、CTP 存在下很易受酶的作用失去, s-RNA 接受氨基酸的

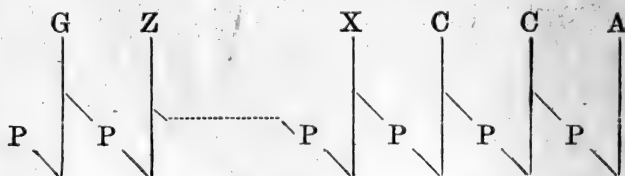


图 5 s-RNA 的末端结构

能力也随之丧失。当加入过量的 CTP,ATP 时,其末端的结构和接受氨基酸的能力又均能恢复,过程可表示如下(图 6)。

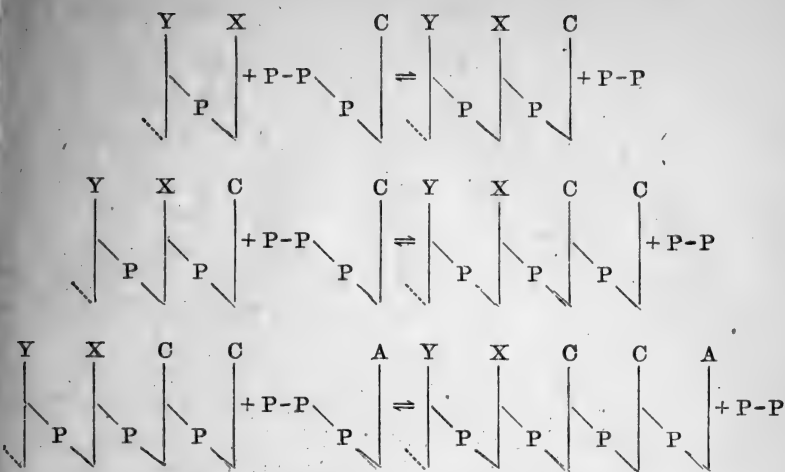


图6 末端核苷酸与 s-RNA 的结合

上述看法的主要根据有以下几点^[31]:

1. s-RNA 在沒有 ATP 和 CTP 的存在下, 和 pH 5 酶保温, 就会失去接受氨基酸的能力。再加入 CTP-C¹⁴ 或 CTP 与 ATP-C¹⁴ 时, 可以从 s-RNA 放射活性的增加証明有 CTP-C¹⁴ 和 ATP-C¹⁴ 的并合。而且在后一情况下, 同时可观察到 s-RNA 接受氨基酸能力的完全恢复。这些事实表明了: pH 5 酶中除氨基酸激活酶外, 还有降解 s-RNA 末端的酶。在沒有 ATP 和 CTP 存在时, s-RNA 会受酶的作用而失去氨基酸并合作用所必需的末端 AMP 与 CMP, 但这一过程是可逆的。

2. 經与 pH 5 酶預先保温的 s-RNA 再与 CTP-C¹⁴ 保温, C¹⁴ 可并合到 s-RNA 中。此产物經碱水解后, 可见有 50% 的 C¹⁴ 在胞核苷中, 50% C¹⁴ 在 2', 3' 胞核苷酸中。因此可以认为有一个分子 CMP 在 s-RNA 的末端, 因为只有末端的核苷酸在碱水解时才能成为核苷。

3. 与 pH 5 酶保温的 s-RNA 再与 ATP, CTP-C¹⁴ 保温, 則在碱水解后, 全部的 C¹⁴ 均在 2' 或 3' CMP 中, 說明在 ATP 存在下, CMP 不再是 s-RNA 的末端。

4. 預先以 pH 5 酶处理的 s-RNA 与 ATP- C^{14} 保温, s-RNA 不带放射性, 也不具有接受氨基酸的能力。加入 CTP 以后, 可以观察到 s-RNA 的放射活性增高, 并能与氨基酸結合, 表明 s-RNA 必先与 CMP 相联, 然后再与 ATP 相联, 方能接受氨基酸。

5. 在最适 pH 附近 CTP- C^{14} , ATP- C^{14} 并合到 s-RNA 的克分子之比近于 2:1。

6. Zacheu 等^[79] 用核糖核酸酶处理带有 C^{14} -亮氨酸的 s-RNA, 从水解产物中分离得到 C^{14} -亮氨酸-腺核苷, 說明腺核苷是 s-RNA 和氨基酸相联的一端的末端。

s-RNA末端的第四个核苷酸也相继有人报告。Canellakis^[15] 将鼠肝 s-RNA 末端的-pCpCpA 用焦磷酸水解法除去后, 与 P^{32} -CTP 及合成酶一起保温, 使 s-RNA 的末端带有 P^{32} -CMP。然后经过分离和水解, 得到的 2' 和 3' CMP 及 2' 和 3' AMP 带有相同活力的 P^{32} 。証明鼠肝 s-RNA 末端的第四个核苷酸是腺嘌呤核苷酸。其过程可以示意如下(图 7):

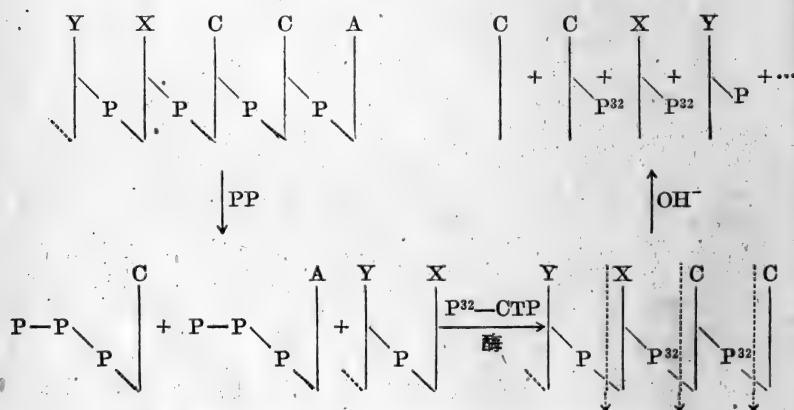


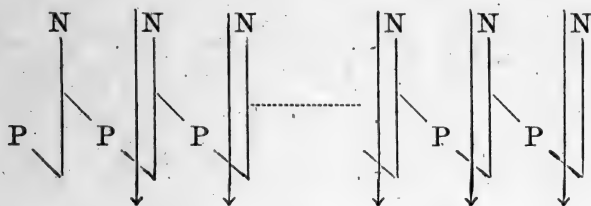
图 7 証明鼠肝 s-RNA 第四个末端核苷酸的示意图

Lagerkvist 等^[46] 用类似的方法也提出第四个核苷酸为腺核苷酸。他們并用 RNase 水解带有 P^{32} 的 s-RNA, 对第五第六个核苷酸的性质做了一些推测。結果如下(表 5)。

表5 大肠杆菌 s-RNA 末端核苷酸鏈排列次序^[6]

末端核苷酸鏈排列次序	所 占 百 分 数
.....pPypApCpCpA	65.1
.....pPypApApCpCpA	1.1
.....pPypGpApCpCpA	3.1
.....pPypGpCpCpA	17.1
.....pPypApGpCpCpA	3.6
.....pPypUpCpCpA	2.6
.....pPypApUpCpCpA	1.4
.....pPypUpCpCpA	2.8
.....pPypTpCpCpA	1.8

s-RNA 的另一端是 5'-鳥嘌呤核苷酸。当具有下列结构的一条多核苷酸鏈,用碱水解时,可以得到三类化合物:(1)2',5'与 3',5'-核苷二磷酸酯,是从带有 5'-磷酸酯的一端断下的;(2)核苷,是



从鏈的另一端断下的;(3)核苷酸。Singer 和 Cantoni^[68]从兔肝 s-RNA 的碱水解产物中,除得到核苷和核苷酸外,还分离出 pGp。証明 s-RNA 的另一端是 5'-鳥嘌呤核苷酸。

Zillig^[69]以大肠杆菌 s-RNA 为材料, Canellkis^[32]以鼠肝 s-RNA 为材料,用类似的方法都得到了相同的結果。

s-RNA 的末端与激活了的氨基酸是怎样相联的呢?它們之間的联結方式可能有两种:酯鍵或酞鍵。根据已有的材料可以认为它們之間是以酯鍵相联的。主要有以下一些証据:

1. s-RNA 与氨基酸之間的連接鍵,在中性或偏酸的情况下,甚至在較高的温度,也相当稳定。例如可以被冷的过氯酸所沉淀;在 10% NaCl 溶液中加热至 100%^[44]。s-RNA 在碱性溶液中的

水解速度亦較氨基酰基磷酸酐类要慢得多。

2. 与氨及羧胺的反应速度,氨基酸-s-RNA 与人工合成的氨基酸-AMP 酯的反应速度很相近似。Zacheu 等^[79]比較了氨基酸衍生物与羧胺的反应速度,結果见表 6。

3. 除去或破坏末端核苷酸 2'和 3'的羟基,如用过碘酸氧化或加入硼酸盐,可以抑制 s-RNA 接受氨基酸的作用。相反,当 s-RNA 与氨基酸相联以后,就不再被过碘酸氧化。

表 6 氨基酸衍生物与 1 M 羧胺在 pH 5.5, 0°C
时之作用

化 合 物	每 小 时 分 解 的 %
亮氨酸乙酯	0
2'/3' 亮氨酸与 AMP 之酯	28
C ¹⁴ -亮氨酸-RNA	41
亮氨酸-AMP 酐	100

但是 s-RNA 与氨基酸形成的酯和普通的酯又不完全相同,因为反应是可逆的,也就是說,在氨基酸激活酶存在下,可从 AMP, PP 和 s-RNA-COCHR 得到 ATP, 所以它是一个具有



高能的酯鍵。

(二) 可溶性核糖核酸的一級結構与其接受氨基酸能力的关系 研究 s-RNA 的一級結構与其活力的关系,一般采用两种办法:

1. 用化学方法改变 s-RNA 碱基結構,观察活力变化。Mirini^[49]将酵母 s-RNA 在 pH 3.7, 25°C 与 HNO₂ 作用一小时,然后测其活力。发现 s-RNA 接受氨基酸的能力有所降低,但因氨基酸的不同而有所差别,酪氨酸为 0.9, 酰氨酸与組氨酸为 0.5, 亮氨酸为 0.3。Zillig 等^[88]报告用同法处理大肠杆菌的 s-RNA,其接受亮氨酸的能力全部丧失。說明某些带有氨基的核苷酸,脱氨以后,能影响 s-RNA 的活力。

2. 将非天然核碱并合到 s-RNA 中。Maono 和 Gros^[52] 在大肠杆菌 ML 308 培养基中, 加入 5-氟尿嘧啶, 发现部分 5-氟尿嘧啶并合到 s-RNA 分子中, 因而影响它和氨基酸结合的能力, 结合被抑制最大的为脯氨酸和酪氨酸。

(三) 可溶性核糖核酸的二级结构与其接受氨基酸能力的关系 前面已经提到 s-RNA 与其他类型的 RNA 一样具有二级结构, 其光密度随着温度与离子强度的不同而有所改变。同时发现 s-RNA 接受氨基酸的能力在 100°C 时逐渐丧失, 因此有人就用加热的方法来研究 s-RNA 的二级结构与其活力的关系。Brown 和 Zubay^[14] 报告 s-RNA (8.9 毫克/毫升) 在 90°C, 0.2M 磷酸缓冲液中加热一小时, 急速冷却至 20°C; 其分子量由原来的 $24,500 \pm 1000$ 增加至 $57,000 \pm 2000$, 光密度与均一性都有改变而接受氨基酸的能力却没有变化。因此他们认为 s-RNA 的活力与其二级结构无关。Berg 等^[54] 也提出了类似的结果。由于 s-RNA 在加热时所引起的光密度的变化, 在冷却时几乎全部恢复。所以在溶液冷却后就难于肯定二级结构对其活力的影响。因此他们在 25, 30, 37, 47 与 55°C 分别测定了 s-RNA 接受缬氨酸与亮氨酸的活力, 发现至 55°C, s-RNA 的活力没有改变。Takanami^[73] 用加热与尿素处理 s-RNA, 也没有影响 s-RNA 的活力。由于 s-RNA 的二级结构具有中等的稳定性和高度的可逆性, 因此上述事实还难于否定 s-RNA 的二级结构与其活力的关系。

六、可溶性核糖核酸有没有种族特异性

关于这个问题各方面的意见还不一致, 未有肯定的结论。有的人认为是非常特异的, 如 Webster^[77] 发现猪肝细胞核的 s-RNA 和细胞质的 s-RNA 不能互相代替。有人则认为 s-RNA 没有种族特异性, 如 Holley 等^[42] 报告鼠肝 s-RNA 和大肠杆菌的 s-RNA 都可以做丙氨酸的受体。Hench 等^[31] 发现哺乳动物的 s-RNA 和面包酵母的 s-RNA 可以互相代替。Allen 和 Schweet^[9] 报告豚鼠肝脏的 s-RNA 可以代替兔网织红细胞 s-RNA 接受

氨基酸。也有人认为有一定的种族特异性,如 Allen 等^[1]发现哺乳动物的 s-RNA 可以彼此互换,但不能用大肠杆菌的 s-RNA 来代替。最近 Benzer 等^[5]又认为 s-RNA 有否种族特异性,依不同的氨基酸而不同。他们比较了酵母 s-RNA 与大肠杆菌 s-RNA 接受酪氨酸、赖氨酸与精氨酸的能力。发现在接受精氨酸与酪氨酸的能力中有很大的区别,而接受赖氨酸的能力却没有显著的不同。他们又用兔肝的酶抽提液来代替大肠杆菌或酵母的酶,不同的氨基酸也得到了不同的结果。发现在接受精氨酸的能力上,兔酶与大肠杆菌酶相近似。而接受酪氨酸时,却又与酵母相似(表 7,8)。

表 7 大肠杆菌 s-RNA 与酵母 s-RNA 接受 C¹⁴-精氨酸的相对活力^[5]

酶 抽 提 液	大肠杆菌 s-RNA	酵母 s-RNA
大肠杆菌	1.00	0.02
酵母	0.01	1.00
兔	1.18	0.02

表 8 大肠杆菌 s-RNA 与酵母 s-RNA 接受 C¹⁴-酪氨酸的相对活力^[5]

酶 抽 提 液	大肠杆菌 s-RNA	酵母 s-RNA
大肠杆菌	1.00	0.10
酵母	0.05	1.00
兔	0.01	1.12

七、结 束 语

s-RNA 自 1957 年被发现以后,就引起了各国许多学者的重视。因为这一课题的进一步研究不仅在阐明蛋白合成的机制有其重要的意义,并且在解决核酸的结构及其与功能之间的关系问题中可以提供重要的线索。因此在短短的几年中很快就成为生化学研究的中心问题之一,出现了大量的工作。对 s-RNA 的提纯、理化性质以及其在蛋白质生物合成中的作用等各方面都有了比较

詳細的研究，解決了不少問題。目前關於專一於某一個氨基酸的 s-RNA 的提純方法也有較快的進展，如果這一問題獲得更進一步的解決，將為核酸結構的研究提供良好材料。根據現有的資料，知道與不同氨基酸相聯結的不同 s-RNA 均具有相同的末端，而 s-RNA 的二級結構又被某些學者認為與接受氨基酸的能力無關。因此 s-RNA 的結構與其接受氨基酸能力以及特异性之間的关系是值得進一步探討的問題。

參 考 文 獻

- [1] Allen, E. M., Glassman, E. and Schweet, R. S., *J. Biol. Chem.*, **235**: 1061, 1960.
- [2] Allen, E. M. and Schweet, R. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **39**: 185, 1959.
- [3] Apgar, J., Holley, R. W. and Merrill, S. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **53**: 220, 1961.
- [4] Apgar, J., Holley, R. W. and Merrill, S. H., *J. Biol. Chem.*, **237**: 796, 1962.
- [5] Benzer, S. and Weisblum, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**: 1149, 1961.
- [6] Berg, P., *Ann. Rev. Biochem.*, p. 293, 1961.
- [7] Berg, P., Bergmann, F. H. Ofengand, E. J. and Dieckman, M., *J. Biol. Chem.*, **236**: 1726, 1961.
- [8] Berg, P. and Ofengand, E. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**: 78, 1958.
- [9] Bergmann, F. H., Berg, P., Preiss, J., Ofengand, E. J. and Dieckman, M.: *Fed. Proc.*, **18**: 191, 1959.
- [10] Bloemendal, H. and Bosch, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**: 244, 1959.
- [11] Bolton, E. T., *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, 1958, p. 275, *The Nucleic Acids*, Vol. III, p. 360.
- [12] Bosch, L., Bleemedal, H. and Sluysen, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 444, 1960.
- [13] Brown, G. L. In "Microbiol. Genetics", the 10th Symp. Soc. Gen. Microbiol., p. 208, 1960.
- [14] Brown, G. L. and Zuhay, G., *J. Mol. Biol.*, **2**: 287, 1960.
- [15] Canellakis, E. S. and Herbert, E., *Biochim. Biophys. Acta*, **47**: 78,

1961.

- [16] Cox, R. A. and Litlaner, U. Z., *J. Mol. Biol.*, **2**: 167, 1960.
- [17] Doctor, B. P., Apgar, J. and Holley, R. W., *J. Biol. Chem.*, **236**: 1117, 1961.
- [18] Doty, P., Boedtker, H., Fresco, J. R., Haefliger, R. and Litt, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**: 482, 1959.
- [19] Dunn, D. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **34**: 286, 1959.
- [20] Everett, G. A., Merrill, S. M. and Holley, R. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 5757, 1960.
- [21] Fraser, M. J. and Gutfreund, *Proc. Roy. Soc., B*, **149**, 392, 1958.
- [22] Fraser, M. J., Shimizu, H. and Gutfreund, *Biochem. J.*, **72**: 141, 1959.
- [23] Fresco, J. R. and Alberts, B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**: 311, 1960.
- [24] Gillchrist, W. C. and Bock, R. M., In "Microsomal Particles and Protein Synthesis" (R. B. Roberts ed.) p. 7. Pergmann Press London, 1958.
- [25] Goldthwait, D. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **30**: 643, 1958.
- [26] Goldthwait, D. A., *J. Biol. Chem.*, **234**: 3245, 1959.
- [27] Goldthwait, D. A. and Starr, J. L., *J. Biol. Chem.*, **235**: 2025, 1960.
- [28] Guthfreund, H., *Biochem. J.*, **72**: 309, 1957.
- [29] Hartmann, G. and Coy, U., *Biochim. Biophys. Acta*, **47**: 612, 1961.
- [30] Hecht, L. T., Stephenson, M. L. and Zamecnik, P. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **29**: 460, 1958.
- [31] Hecht, L. I., Stephenson, M. L. and Zamecnik, P. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**: 505, 1959.
- [32] Herbert, E. and Canellakis, E. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 363, 1960.
- [33] Hoagland, M. B. in "The Nucleic Acids" (ed. E. Chargaff and J. N. Davidson) Vol. III. Chapter 37, p. 349.
- [34] Hoagland, M. B. Keller, E. B., Zamecnik, P. C., *J. Biol. Chem.*, **218**: 345, 1956.
- [35] Hoagland, M. B., Keller, E. B. and Zamecnik, P. C., *J. Biol. Chem.*, **221**: 45, 1956.
- [36] Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I. and Zamecnik, P. C., *J. Biol. Chem.*, **231**: 241, 1958.
- [37] Hoagland, M. B., Zamecnik, P. C. and Stephenson, M. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **24**: 215, 1957.
- [38] Holley, R. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 658, 1957.

- [39] Holley, R. W., Apgar, J., Doctor, B. P., Jarrow, J., Marini, M. A. and Merrill, S. H., *J. Biol. Chem.*, **236**: 200, 1961.
- [40] Holley, R. W. and Doctor, B. P., *Federation Proc.*, **19**: 348, 1960.
- [41] Holley, R. W., Doctor, B. P., Merrill, S. H. and Saad, F. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**: 272, 1959.
- [42] Holley, R. W. and Goldstein, J., *J. Biol. Chem.*, **234**: 1765, 1959.
- [43] Holley, R. W. and Prock, P., *Fed. Proc.*, **17**: 244, 1958.
- [44] Ichimura, K., Izawa, M., Oota, Y., *Plant and Cell Physiol.*, **1**: 317, 1960.
- [45] Klee, W. A. and Cantoni, G. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**: 322, 1960.
- [46] Lagerkvist, U., Berg, P., Dieckmann, M. and Platt, F. W., *Federation Proc.*, **20**: 363, 1961.
- [47] Leahy, J., Allen, E. H. and Schweet, R. S., *Fed. Proc.*, **18**: 270, 1959.
- [48] Magasanik, in "The Nucleic Acids" (ed. E. Chargaff and J. N. Davidson) Vol. I., p. 373, Academic Press, New York, 1955.
- [49] Marini, M. A., *Fed. Proc.*, **19**: 349, 1960.
- [50] Miura Kin-I Chiro, *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 62, 1962.
- [51] Monier, R., Stephenson, M. L. and Zamecnik, P. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 1, 1960.
- [52] Maono, S. and Gros, F., *Compt. Rend.*, **250**: 3527, 1960.
- [53] Nathans, D., Ehrenstein, G., Von Monro, R. and Lipmann, F., *Fed. Proc.*, **21**: 127, 1962.
- [54] Ofengand, E. J., Dieckmann, M. and Berg, P., *J. Biol. Chem.*, **236**: 1741, 1961.
- [55] Ogata, K. and Nohara, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **31**: 149, 1959.
- [56] Ogata, K., Nohara, H. and Miyaza, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **32**: 287, 1959.
- [57] Osawa, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 110, 1960.
- [58] Osawa, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 244, 1960.
- [59] Otaka, E., *Exp. Cell Res.* **21**: 229, 1960.
- [60] Press, J., Berg, P., Ofengand, L. J., Bergmann, F. H. and Dieckmann, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**: 319, 1959.
- [61] Raache, L. D. in "Metabolic Pathways" Vol. II. Chapter 17, p. 263.
- [62] Rosenbaum, M. and Brown, R. A., *Analytical Biochem.*, **2**: 15, 1961.
- [63] Saponara, A. and Boch, R. M., *Fed. Proc.* **20**: 356, 1961.
- [64] Schweet, R. S., Borard, F. C., Allen, E. H. and Glassmann, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**: 173, 1958.
- [65] Schweet, R. S. 1959. (The Nucleic Acids, Vol. III. p. 360)

- [66] Schweet, R. S., Glassman, E. and Allen, E. H., *Federation Proc.* **17**: 307, 1958.
- [67] Schweet, R. S., Lamform, H. and Allen, E. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**: 1029, 1958.
- [68] Singer, M. F. and Cantoni, G. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **39**: 182, 1960.
- [69] Singer, M. F., Luborsky, S., Marrison, R. M. and Cantoni, G. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **38**: 568, 1960.
- [70] Smith, K. C., Cordes, E. and Schweet, R. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **33**: 286, 1959.
- [71] Spahr, P. F. and Tissieres, A., *J. Mol. Biol.* **1**: 237, 1959.
- [72] Stephenson, M. L. and Zamecnik, P. C., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**: 1627, 1961.
- [73] Takanami, M., *J. Mol. Biol.* **3**: 476, 1961.
- [74] Takanami, M., Nishiyama, K. and Watanabe, I., *Biochim. Biophys. Acta*, **47**: 193, 1961.
- [75] Tissieres, A., *J. Mol. Biol.* **1**: 365, 1959.
- [76] Webster, G. C., *Arch. Biochim. Biophys.* **82**: 125, 1959.
- [77] Webster, G. C., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **2**: 56, 1960.
- [78] Weiss, S. B., Acs, G. and Lipmann, F. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**: 189, 1958.
- [79] Zacheu, H. G., Acs, G. and Lipmann, F. L., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44**: 885, 1958.
- [80] Zacheu, H. G., Tada, M., Lawson, W. B. and Schweiger, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **53**: 221, 1961.
- [81] Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L. and Scatt, J. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**: 611, 1960.
- [82] Hartman, G. and Coy, U., *Biochim. Biophys. Acta*, **47**: 612, 1961.
- [83] Zillig, W., Schaetschabul, D. and Krone, W., *Z. Physiol. Chem.*, **318**: 100, 1960.
- [84] 大鷹英子: 蛋白質, 酵素, 核酸 **6**, **11**, 1961.

第五讲 核朊微粒与蛋白 质的生物合成

刘 培 楠

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、微粒体的形态与核朊微粒的制备

細胞中的蛋白质生物合成研究，自从采用标记氨基酸技术和无細胞体系之后，发现了氨基酸的并合作用在細胞质中最为旺盛，而在細胞质中又以微粒体部分为蛋白质生物合成的主要部位^[122,158]。

(一) 微粒体的发现 1937年 Claude^[27]报导从 Rous 肉瘤糜中經用分部超速旋离法分离出一种亚細胞部分，其中含有丰富的核糖核酸(RNA)，以后并从鸡胚胎及若干肿瘤中分离出这种亚細胞部分^[28-30]。Claude 认为这是細胞中原有的結構部分，而不是由于研磨而造成的人为的細胞质聚集现象，称之为微粒体^[31]。微粒体是磷脂和核糖核蛋白所形成的复合体^[29, 30]。由于微粒体中含有大量的 RNA，它和細胞质中的“嗜碱质”是相当的，在 Brachet^[17] 和 Caspersson^[21] 的研究中証明了这些“嗜碱质”与蛋白质生物合成的关系之后，說明微粒体和“嗜碱质”不过是由于不同技术所表现的細胞质中相同結構的不同名称而已^[101]。

Palade 认为細胞质的网状結構是一种連續的結構，因称之为內质网，有的生物学家則称之为动质。在研磨組織匀浆时，此网状結構被破坏，超速旋离下所得沉淀就是这些碎片，这就是 Claude 所謂的微粒体^[102,103]（生物化学家一般指在 105,000 g 旋离下来的細胞匀浆部分为微粒体）。所以有些生物学家不承认微粒体是

独立的細胞結構。

(二) 微粒体的形状和大小 Claude 所分离的微粒体是应用水或稀磷酸緩冲液或 0.15M 氯化鈉溶液为介质,在 $18,000 \times g$ 下旋离 1 小时而获得的。目前一般則采用蔗糖溶液 (从 0.25 ~ 0.88 M), 由于介质的密度和粘度都增高了, 离心力就須增加到 $100,000 g$ 1~2 小时。所以严格地說, 在不同情况下所得到的微粒体是难以比較^[101]。在同一离心速度下, 因旋离的时间长短, 也可能得到不同的微粒体部分, 如 Palade 用豚鼠胰腺匀浆进行分部旋离, 在 $105,000 g$ 1 小时的离心力下可分出微粒体部分 (M), 将其上清液再在用离心力下旋离 2 小时, 又可得到一些沉降物, 称为第一后微粒体部分 (PM_1), 由此所得上清液再在同离心力下旋离 16 小时, 則得到第二后微粒体部分 (PM_2)^[101]。这三部分 (M, PM_1 , PM_2) 都含有核糖核蛋白顆粒, M 部分中含較多的磷脂, 而在 PM_1 和 PM_2 部分中磷脂量就很少。在不同組織中的微粒体的成分是不相同的, 如肝的微粒体所含磷脂的量比在胰微粒体中的要多 8 倍^[101]。因此不同来源的微粒体或不同条件下所得到的微粒体其組成可以不同。

(三) 核膜微粒的制备 从电子显微鏡观察豚鼠胰腺或大鼠肝的微粒体, 可见有許多小顆粒 (約为 15 毫微米密集于膜状物上, 膜的厚度約为 7 毫微米^[102], 成为粗糙状的內质网, 有的膜上小顆粒較少, 則成为較为光滑的內质网。这样的內质网經化学药品处理后可以发生一些变化: (1) 如用 2% 的乙烯二氨基四乙酸 (EDTA) 处理上述微粒体 60 分钟 ($0^\circ C$), 就有約 60% RNA 从微粒体上失去; (2) 如用核糖核酸酶 (溶于 0.88 M 蔗糖溶液中) 处理 60 分钟 ($37^\circ C$), RNA 的损失量約为 85%; (3) 如用 0.5% 脫氧胆酸鈉的 0.88 M 蔗糖液 (pH 为 7.5) 处理大鼠肝微粒体, 則可将其蛋白质与磷质部分溶解, 旋离后沉淀部分含有約 80% 的 RNA 和約 15% 的蛋白质, 因此目前认为內质网是由下列两部分組成的:

1. 脫氧胆酸鈉溶解部分 內质网的膜状物, 主要成分为蛋白质与磷脂。

2. 脫氧胆酸鈉不溶部分 小顆粒，即核糖核蛋白顆粒，是 RNA 与蛋白质的复合体。

这个核糖核蛋白顆粒經实验証明是細胞质中蛋白质生物合成的主要部分。1958 年美国第一届生物物理学会論文报告会中建議用 ribosome (拟譯为核朊微粒，也有人譯为核糖核蛋白体) 代表大小在 20~100 S 的核糖核蛋白顆粒^[113]。有的文献中用微粒体顆粒 (microsomal particles) 代表核糖核蛋白顆粒則欠明确。細胞质中除有这种附着在膜上的小顆粒外，还有一部分核朊微粒并不附在膜上，而为自由分散状。Palade 认为在上述 PM_1 及 PM_2 部分中这种自由状的核朊微粒較多。在細菌的細胞中看不见有內质网的存在，但可以见到有許多类乎胰腺細胞中的自由核朊微粒^[101]。

純化后的核朊微粒显著地不同于微粒体，例如微粒体含有相当数量的磷脂，在核朊微粒中則很少；在微粒体中核酸与蛋白质的比例有变化，而在純化后的核朊微粒中核酸与蛋白质的比例常較恒定。所以近年来在蛋白质生物合成的研究工作中，用核朊微粒代替在 $105,000 \times g$ 旋离 1 小时所得的微粒体部分作为标记氨基酸的接受体是越来越普遍了，因为有很多优点：可以去除微粒体部分所附着的杂质，活性恒定，因此更有利于研究蛋白质生物合成的机制^[71]。

(四) 細胞核中的核朊微粒 不但在細胞质中有核朊微粒的存在，在細胞核中也已分离出相当于上述核朊微粒的顆粒。較多的报导俱是从小牛胸腺細胞核中提取^[147, 148, 149, 150]，并将其提純研究了它的性质^[106]，也有报导从青豆細胞核中分离核朊微粒^[7]。

二、核朊微粒的生物化学性质

最純的核朊微粒应只含有 RNA 和蛋白质，但按分析的資料其中还含有少量的金属。核朊微粒中 RNA 与蛋白质的比例因来源不同而有所变化，其中 RNA 的变化較少，而蛋白质的变化則較多^[104]。下面所列为 RNA 与蛋白质在不同来源組織或細胞中的平均分布情况：

	RNA (%)	蛋白质(%)
哺乳动物 ^[101]	40~50	60~50
植物 ^[137]	40~50	60~50
微生物 ^[135]	60~65	40~35

在細菌中 RNA 与蛋白质間比例的变化与下列几种因素有关: 第一, 生长的情况和生长的速度^[85]; 第二, 核阮微粒的含量^[92]; 第三, 不同类型核阮微粒的分布^[4, 88]。由化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) 中所分离出的核阮微粒在性质上和大肠杆菌的核阮微粒不同^[134], 如前者的 50 S 顆粒在透析与冷冻干燥后仍能溶解而不变其结构, 即使增加鎂离子浓度到 0.05 M, 也沒有比 70 S 更大的顆粒出现。大肠杆菌核阮顆粒的情况即非如此(见下面“三”节)。

(一) 核苷酸組成 从表 1 的上段可见青豆芽梗核阮微粒中 RNA 的核苷酸組成与兔和羊的网織細胞中者有显著的区别, 在动物細胞中鳥便嘌呤核苷酸与胞嘧啶核苷酸的量均比其他两种核苷

表 1 若干植物及动物来源^[145]与若干微生物及动物来源的^[62]核阮微粒中核苷酸的組成

核 阮 微 粒	腺嘌呤核苷酸	鳥便嘌呤核苷酸	胞嘧啶核苷酸	尿嘧啶核苷酸
青豆芽梗	0.243±0.020	0.314±0.011	0.223±0.007	0.220±0.014
兔网織細胞	0.186±0.010	0.345±0.014	0.287±0.012	0.182±0.006
羊网織細胞, 1	0.188±0.005	0.310±0.006	0.322±0.003	0.180±0.004
羊网織細胞, 2	0.178±0.005	0.327±0.006	0.302±0.013	0.193±0.007
羊网織細胞, 3	0.180±0.006	0.344±0.008	0.303±0.002	0.173±0.003
	腺 嘌 呤	鳥 便 嘌 呤	胞 嘧 啶	尿 嘧 啶
大肠杆菌	10	12.2	8.7	8.0
大肠杆菌, 30 S	10	13.0	9.7	8.4
大肠杆菌, 50 S	10	13.2	7.3	6.9
固氮菌, <i>A. vinolandii</i>	10	9.6	7.6	9.6
面包酵母	10	10.1	7.1	8.6
大鼠肝	10	17.5	15.8	10.1
兔肝	10	15.9	15.5	10.3
小鼠艾氏腹水癌	10	20.6	14.1	10.3

酸的量为高得多,在表 1 的下段也可见到这种情况,而在植物細胞或微生物細胞中这种差异就較不明显了。Wallase 及 Ts'o^[145] 曾考虑到合成不同血紅素(Hb I 及 Hb II)应有不同的核朊微粒,其中 RNA 的核苷酸組成可能和所成的血紅素的氨基酸組成有关系,但是从目前的分析結果还难作出这样的結論。

在核朊微粒中只有微量的 5-核糖酰尿嘧啶核苷酸(5-rUMP)和其他少见的核碱^[41, 81, 99, 125]。有人认为核朊微粒中的 5-核糖酰尿嘧啶可能由于可溶性核糖核酸(s-RNA)的混杂所致;在大肠杆菌的 s-RNA 中 5-核糖酰尿嘧啶核苷酸与尿嘧啶核苷酸之比为 14:100,而在 70 S 的核朊微粒中此比数則为 0.8:100^[37],在大鼠肝細胞浆的 s-RNA 中这个比数为 25:100,在核朊微粒中这个比数为 7.5:100^[40]。

小牛胸腺的核朊微粒的 RNA 的核苷酸組成亦具有含胞嘧啶核苷酸和鳥便嘌呤核苷酸較多的特点^[149]。經過蔗糖液的密度梯度旋离法精制,可得含有 36% RNA 的核糖核蛋白,再經脫氧胆酸的处理以去除大部分的蛋白质,則可得到 78 S 的核朊微粒,其中 RNA 占了 60%^[107],作者还比較了細胞核中不同 RNA 的核苷酸組成(表 2)。

表 2 100M 总核苷酸中各別单核苷酸的克分子数

	腺嘌呤核苷酸	尿嘧啶核苷酸	鳥便嘌呤核苷酸	胞嘧啶核苷酸
总核的 RNA	20.4	19.3	33.3	27.8
核仁的 RNA	21.8	23.5	30.5	25.7
核的核朊微粒 RNA	20.4	18.6	32.7	28.2
核的信使 RNA	29.3	28.4	22.5	19.8
胸腺 RNA	27.6	28.3	22.6	19.9

(二) 蛋白质及其氨基酸組成 表 3 为不同来源核朊微粒中蛋白质的氨基酸組成^[139],核朊微粒中約含 40~60% 蛋白质。对于此蛋白质的性质还不清楚, Bulter 等^[20]认为是碱性蛋白,类似組蛋白。80 S 核朊微粒含有 230 个分子量为 12,000 的单位蛋白^[158]。Roberts 等^[118]进行大肠杆菌核朊微粒在 DEAE 柱上层

析,发现其中蛋白质是非均一性的,但在不同大小核膜微粒之间的氨基酸组成则互相类似。最近 Spahr^[126] 分析了大肠杆菌 30 S, 50 S 和 70 S 颗粒中的氨基酸组成,发现其中有大量的赖氨酸、组氨酸与精氨酸,在 30 S 与 50 S 间,组氨酸、丙氨酸、缬氨酸、谷氨酸、精氨酸等的含量是有明显区别的。根据 Roberts 等的分析^[114] 大肠杆菌核膜微粒的蛋白质组成中谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸及赖氨酸等的含量较全细胞为高,蛋氨酸和门冬氨酸则较低,而胱氨酸和

表 3 不同来源核膜微粒中蛋白质的氨基酸组成

氨基酸	葫蘿卜黄 斑紋病毒 (a)	烟草斑紋 病毒(a)	青豆芽 (a)	兔网織 細胞(a)	大鼠肝 (b)	大肠杆菌(c)		
						70 S	50 S	30S(d)
丙氨酸	5.4	5.1	5.4	5.4	5.92	36.1	39.1	36.5
門冬氨酸	6.3	9.8	9.6	8.8	5.57	1.3(e)	1.0(e)	1.65(e)
精氨酸	2.2	13.5	9.2	11.8	20.9			
胱氨酸	0	0.69 (半胱氨酸)	0.3	1.1	—			
谷氨酸	7.7	11.3	10.7	11.5	6.13			
甘氨酸	3.8	1.9	8.7	7.1	5.33			
組氨酸	1.6	0	2.9	2.8	4.93			
异亮氨酸	7.4	6.6	6.4	5.7	3.40			
亮氨酸	8.6	9.3	8.2	8.7	6.01			
賴氨酸	5.0	1.47	12.2	12.7	13.3	0.95	—	—
蛋氨酸	2.1	0	2.0	2.0	1.48	46.3	47.9	46.2
苯丙氨酸	3.6	8.4	4.8	4.4	2.63			
脯氨酸	11.8	5.8	5.2	4.7	3.41			
絲氨酸	6.7	7.2	2.5~10	1.8~10	3.35	11.5	10.5	12.5
缬氨酸	12.2	9.9	4.9	4.8	3.49	3.85	1.5	3.15
色氨酸	—	2.1	1.5	1.2	1.04			
酪氨酸	2.2	3.8	7.0	6.5	2.02			
纈氨酸	6.2	9.2	7.6	7.2	5.51			
磺丙氨酸					0.74			
	93.1	100.0	106.0	106.0	100.0			

(a) 按克/100 克蛋白质計^[137];

(b) 按 N%/总 N 量計^[34];

(c) 按 NH₂ 末端基/总末端基的百分数計^[114], 引用部分資料(E)的平均数;

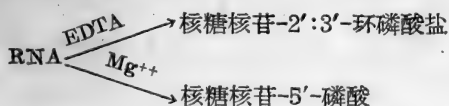
(d) 有 20% 的 50 S 的掺杂;

(e) 与谷氨酸合量。

半胱氨酸都不存在，这些組成上异同的意义还不知道。小牛胸腺細胞核的核朊微粒中氨基酸組成和其他細胞的細胞漿核朊微粒中者很相类似^[149]。經用 Lubrol W 过氟癸酸鈉或脫氧胆酸鈉所析出的大鼠肝微粒体蛋白质的碱性氨基酸量是較原来微粒体中者多些，其中碱性氨基酸与酸性氨基酸的比例为 1.3~1.5^[32]。表 3 显示几种不同来源核朊微粒中蛋白质的氨基酸組成的相似情况。

(三) 酶活性 除了从氨基酸与 RNA 形成复合物将氨基酸轉移到核朊微粒上需有特异的酶参加之外^[10, 132, 133]，核朊微粒本身是否具有酶的活性，是一个难以解决的問題。因为核朊微粒是蛋白质，和其他蛋白质(包括酶)性质相同并且有联系，蛋白质中常存在着酶的活性而不易分离；其次，与蛋白质合成有关的酶也可能附着在核朊微粒的表面上；第三，酶的合成亦在核朊微粒上进行，因此难以区别何者是原来所有的酶，何者是新合成的酶。

目前文献中报导与核朊微粒有关的酶有下列几种：葡萄糖-6-磷酸酶^[59]，核苷酸-細胞色素 C 还原酶^[65]，細胞色素 m 或 b₅^[5, 130]，焦磷酸-腺苷三磷酸交换反应的酶^[64]，核糖核酸酶^[44, 134, 140]和脫氧核糖核酸酶^[47]。Elson 及 Tal^[45, 47] 认为大肠杆菌中的核糖核酸酶和脫氧核糖核酸酶都必須在核蛋白結構被破坏之后才起水解核酸的作用。核糖核酸酶几完全和 30 S 顆粒相結合，此外亦証明了核朊微粒和 β 糖苷酶相結合^[33, 56, 70] 酵母核朊微粒和丙糖磷酸脱氢酶相結合^[149]。再大肠杆菌的核朊微粒具有多核苷酸磷酸二酯酶和多核苷酸磷酸化酶，因此能催化下列反应^[143]：



綠脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的核朊微粒中有多核苷酸磷酸化酶的活性^[129]。

細胞核的核朊微粒中也有酶活性的存在^[146]。在小牛胸腺細胞核中有苹果酸脫氢酶，乳酸脫氢酶，谷氨酸脫氢酶， β 羥基丁酸酰輔酶 A 脫氢酶，葡萄糖-6-磷酸脫氢酶，异构檸檬酸脫氢酶，需

Mg^{++} 激活的三磷酸腺苷酶, β -葡萄糖酸酶等。

三、核朊微粒的形态与其生化活性

(一) 核朊微粒的聚合与解离 核朊微粒的形状大体上为球形,其直径大小不一,自 150 至 350 Å;一般都采用超速旋离的沉降系数来表示核朊微粒的大小。近年来不少文献报导核朊微粒的大小与分离时介质的 pH 值、离子强度以及其中二价阳离子的浓度有密切的关系。从电子显微镜图上所显示干燥的核朊微粒类乎球状,它的直径为 200 Å,高度为 185 Å,体积为 $3.9 \times 10^6 \text{ Å}^3$,分子量为 3.7×10^6 。如按 X 綫衍射测定其均方半径 (radius of gyration),则可测得此种顆粒在溶液中外半径为 170 Å,相当的含水体积为 $20.5 \times 10^6 \text{ Å}^3$ 。由此可以計算出每克干燥的核朊微粒可与 2.7 克的水相結合^[38]。这个結果和沉降系数、粘度以及部分比容等測定結果相符。按 Hart^[58] 的电子显微镜观察比較冷冻干燥与空气干燥的大肠杆菌 50 S 顆粒的体积,冷冻干燥者为 $160 \text{ Å} \times 230 \text{ Å}$,体积为 $4.6 \times 10^6 \text{ Å}^3$;空气干燥者体积为 $3.3 \times 10^6 \text{ Å}^3$ 。不同来源的核朊微粒有共同性亦有相异之处。以下将分別叙述由微生物、植物与动物的核朊微粒的形态与性质:

1. 微生物中的核朊微粒 Chao 和 Schachman 从面包酵母^[25]中分离出一种沉降系数等于 80 S 的核朊微粒,它的直径为 210 Å,其中 RNA 占 42%,蛋白质占 58%。这种核朊微粒在 0.0015M 磷酸緩冲液中能起解离,但在低离子强度($7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) 的氯化鈣溶液中,或在加有少許硫酸鎂 (0.001M) 的此氯化鈣液中,此 80 S 顆粒的解离就大为减少。80 S 顆粒解离为 60 S 和 40 S 顆粒的过程是可逆的,并和鎂离子的浓度有密切的关系^[24]。在此 80 S 顆粒中 RNA 是和鎂或鈣离子相結合,使核朊微粒的 RNA 亚单位相連^[28]。Maeda^[86] 报导酵母 80 S 顆粒的超速沉降图谱呈两个峰,在含有 0.01 M 鎂离子的溶液中,一为 32 S,一为 19 S;在不含鎂离子而含有 EDTA 的溶液中,一为 28 S,一为 19 S,在前一溶液中快沉降的峰比慢沉降的峰显著,而在后一溶液中情

形适相反。这种变化是可逆的,即增加镁离子的浓度,可使快沉降的部分增加。Maeda 认为在 RNA 中有若干数量的镁离子是不易用透析方法移去的,因其中镁与磷的浓度間有一定的比例,所以結合甚紧,此时 $Mg:P=0.4$ 。如镁与磷的比例小于此数时, RNA 水液呈高色性,此时如有大量的鈉或鉀离子存在,镁离子即被透析出去;如镁与磷的比大于 0.4 时, RNA 溶液呈低色性。这种镁离子的被透析与高色性的关系,說明了 RNA 中具有特异的镁离子的結合位置以形成核碱間的氢键。

Edelman, T s'o 及 Vinograd 等^[43] 研究镁离子和微粒体中核阮微粒的結合情况,发现几乎核阮微粒中所有的镁是和 RNA 部分相結合,在移去蛋白质部分后,镁离子的結合量可以增加 30%。镁离子与 RNA 結合的位置是在磷酸根上。用 $K:Mg$ 值为 33 的緩冲液制备核阮微粒可以得到完整的 80 S 顆粒,其 $Mg:P$ 的克分子比为 0.3;当 $K:Mg$ 值为 95 时,核阮微粒的 $Mg:P$ 的克分子比降低到 0.2,此时 80 S 顆粒就发生解离,所以作者們认为镁离子有着将核阮微粒的亚单位合在一起的作用。

最近 Morgan^[98] 报导酵母中 60 S 的核阮微粒并不稳定,能轉变为 50 S 的顆粒。

从固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 中所分离出来的核阮微粒,在超速旋离下出现一个峰,其沉降系数为 86 S。这种 86 S 顆粒在下述不同情况下所起的解离与聚合也不相同:(1)如将此細菌的核阮微粒提出后置於含 0.001 M 镁离子的緩冲液中,則出现五个峰,其沉降系数为 86, 77, 58, 39, 10 S (校正至 20°, 浓度为 0)^[50]。(2)如将 86 S 顆粒析出悬浮于含有 0.001 M 硫酸镁的 0.002 M 磷酸緩冲液中,其 pH 为 7.05,再加氯化鈉使离子强度总数为 0.03,則此 86 S 顆粒即解离为 58 S 与 39 S。(3)或将 86 S 顆粒在 0.002 M 磷酸緩冲液中透析,也能得到 58 S 与 39 S 的顆粒。(4)如将镁离子浓度增至 0.005 M, 58 S 及 39 S 的顆粒又会复合为 86 S 顆粒。所以 86 S 顆粒的稳定度与两价阳离子 (镁离子) 的浓度有很大的关系。另一方面,此 86 S 顆粒在蔗糖溶液中,

或浓盐溶液中，或有核糖核酸酶存在时俱不稳定。其他如螯化剂（如EDTA）的作用，pH 值的变化，也都能减低核糖微粒的稳定性^[12]。

在大肠杆菌的细胞中曾分离出 100 S 的核糖微粒，并证明了此 100 S 颗粒，解离成为两个 70 S 颗粒是可逆的，在此可逆性的解离中镁离子浓度的作用甚为显著^[184]。用电子显微镜观察大肠杆菌的微粒体，也可以看到其中有不同大小的颗粒，其沉降系数为 100, 70, 50, 30 S。100 S 颗粒是两个 70 S 颗粒联合而成的双体，在 70 S 颗粒中可见由一大 (50 S) 与一小 (30 S) 颗粒相联合的一条沟痕。50 S 的颗粒则可形成 81 S 颗粒的双体^[55, 67]。图 1 是这些颗粒的形状示意及其若干常数。





				
沉降系数	30 S	50 S	70 S	100 S
可逆解离	2(30 S)	+2(50 S)	\rightleftharpoons 2(70 S)	\rightleftharpoons 100 S
大 小	95 × 170 Å	140 × 170 Å	150 ~ 200 × 170 Å	350 ~ 400 × 140 Å
分子 量	1×10^6	1.8×10^6	3.1×10^6	5.9×10^6
形 状	扁椭圆形	不规则球形	不规则球形	双 体

图 1 大肠杆菌核糖微粒的双体与其亚单位的大概形状^[45, 67]

可见从两个亚单位形成的核糖微粒是近似球形的。从电子显微镜所见的较小亚单位为不对称的形状，与这些颗粒的粘度性状是相符合的^[183]，图 2~4 为不同核糖微粒的电子显微镜照片。

大肠杆菌中 70 S 核糖微粒（分子量为 3×10^6 ^[45]）解离为 30 S（分子量为 1×10^6 ^[45]）与 50 S（分子量为 2×10^6 ^[45]）的颗粒时，30 S 颗粒中含有 18 S 的 RNA，而 50 S 的颗粒则含有 18 S 与 28 S 的 RNA。除此之外，在细胞抽提物中还有少量的核糖微粒，其中 RNA 为 4 S 和 8 S。去镁离子后，在低离子强度的溶液中进行透析和加热都能促进大的核糖微粒解离为小的颗粒（13.1 S, 8.8 S 和 4.4 S），处理的时间越长，小分子量的颗粒越多^[8]。用 C¹⁴ 尿嘧啶为标记进行大肠杆菌中核糖微粒 RNA 的合成研究^[90]，证明小

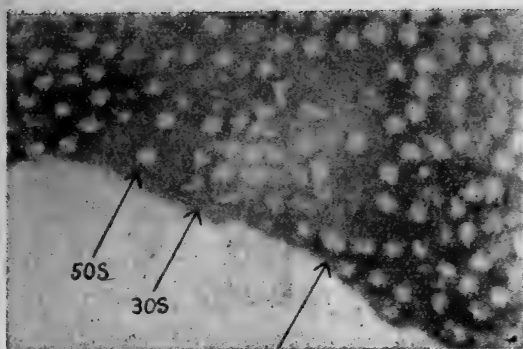


图 2

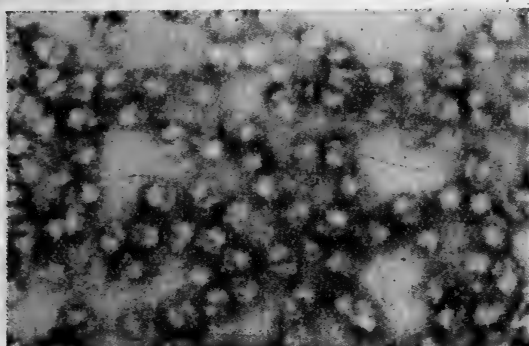


图 3

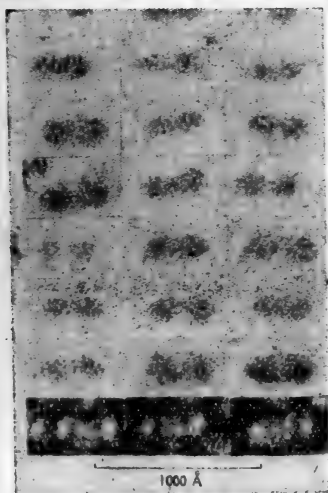


图 4

图 2~4 不同核肫微粒的电子显微镜照片

的核糖微粒是大的核糖微粒的前身物，而小分子 RNA 是大分子 RNA 的前身物。

不但同一来源(大肠杆菌或酵母)而不同大小的核糖微粒在适宜的镁离子浓度下可以集聚成为较大的核糖微粒，Lederberg 与 Lederberg^[78] 用大肠杆菌与枯草杆菌的核糖微粒放在一定镁离子浓度下也可得杂交的大颗粒核糖微粒：

(1) 30 S (大肠杆菌) + 50 S (枯草杆菌) $\xrightarrow[30', 20^\circ\text{C}]{5 \times 10^{-4}\text{M Mg}^{++}}$ 82S, 70 S, 50 S, 30 S

(2) 30 S (大肠杆菌) + 50 S (枯草杆菌) $\xrightarrow[30', 20^\circ\text{C}]{10^{-2}\text{M Mg}^{++}}$ 82 S, 70S, 50 S

Lederberg 等认为不同大小核糖微粒的集聚是依赖于 30 S 与 50 S 颗粒磷酸根间的镁离子键的一级结构，这种一级结构应不表现任何特异性。

2. 植物中的核糖微粒 从青豆芽中所分离的核糖微粒与酵母中的很相似，其蛋白质与 RNA 之比为 6.4，分子量约为 $4 \sim 4.5 \times 10^6$ 。在电子显微镜下呈扁球形^[188]。它的 80 S 颗粒与 60 S 及 40 S 颗粒之间呈可逆的转变，如表 4 所示。改变 pH 值，减低离子强度，和改变镁离子的浓度都能影响 80 S 颗粒的解离与复合，这和上节所述微生物的核糖微粒性质相似。因为增高 pH 值和增大磷酸缓冲液浓度都能将镁离子从核糖微粒上移去，从而促进其解离。用透析和 EDTA 都能促进 80 S 颗粒解离。增加镁离子浓度或降低 pH 值则可使已解离的 60 S 与 40 S 的颗粒转而复合为 80S 的颗粒。青豆芽中的核糖微粒(每毫克干重)含有 $0.31 \mu\text{M}$ 的镁和 $0.05 \mu\text{M}$ 的钙。这两种离子间是否有恒定的比例还不知道。根据 Abdul-Nour 和 Webster 的观察^[1]，不但镁离子与钙离子能使核糖微粒的亚单位重合，锰和钴离子也都有这种作用。

在麦胚细胞中可以提出一种 70 S 的颗粒，需有镁、锰、钙三种离子同时存在才能保持此颗粒于透析时不被解离。在三种离子之中又以锰离子的作用最为显著。1 毫克的 RNA 需要 $0.12 \sim 0.14$ 微克的锰离子。但是这种 70 S 颗粒一经解离便不易复合，呈不可

表4 青豆芽核朊微粒的可逆转变^[136]

pH	离子强度	緩 冲 液		解 离 程 度
6.5	0.025	磷	酸	80 S→60 S+40 S. 6%
7.5	0.05	磷	酸	80 S→60 S+40 S. 50%
8.5		磷	酸	80 S→60 S+40 S. 80%
复 合				
7.5	0.05	磷	酸 + $5 \times 10^{-4} \text{M Mg}^{++}$	60 S+40 S→80 S
7.5→6.5	0.05	磷	酸	60 S+40 S→80 S

逆之状^[83]。

在白金花菜叶中提出的核蛋白有两个組成，一个为 83 S，一个为 68~70 S，前者較稳定，RNA 的含量为 50~55%，在磷酸緩冲液中或透析时解离为亚单位。当有鎂离子存在时則能阻止其解离^[84]。

从菠菜中分离出的核朊微粒含 RNA 約为 45%，也可解离为亚单位^[85]。

3. 动物組織中的核朊微粒 在动物組織中的核朊微粒的性质基本上和上述微生物与植物中者相似。所不同者在細菌中这些顆粒呈分散状，而在动物組織的細胞中核朊微粒大部分是附着在内质网的膜状物之上，而一部分則分散在細胞质之中。Petermann 等^[105]将大鼠肝核朊微粒进行超速旋离分析，从其沉降图譜可以观察到有 B, C, E 三个部分。当只有微量的鎂离子时，大部分的微粒体中核朊微粒（在 78,000g 50 分钟下获得的）主要为 B 部和少量的 C 和 E 部（见图 5），而在小部分微粒体中的核朊微粒（在 78,000g 5 小时下获得的）則含有較多量 C 和 E。当有 0.0024 M 鎂离子时，所有各核朊微粒部分都呈显 C 和 E 的减少。改变鎂离子的浓度显著地影响了核朊微粒沉降图譜中的分布情况（图 5）。所以鎂离子浓度的增加能促进核朊微粒 B 部的稳定度，另一方面也能使較小的核朊微粒复合为大的顆粒。在图 6 中①表示因无鎂离子，E 峰增多；②表示鎂离子为 0.0005 M 时，B 峰較③所示减

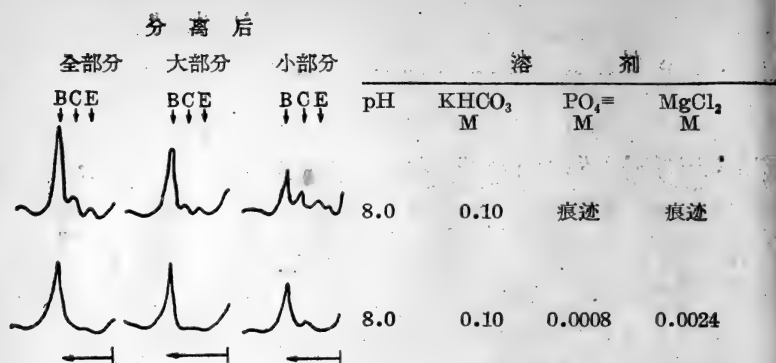


图 5 大鼠肝的核脱微粒的超速旋离沉降图^[104]

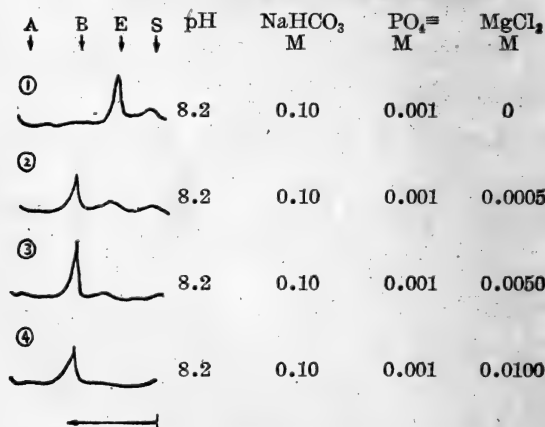


图 6 镁离子对核脱微粒稳定度的影响^[103]

少；③为新鲜的核脱微粒，透析过夜无改变；④显示E峰的减少，但B峰的减低可能由于一部分 RNA 在此情况下被析出所致。

在 Jensen 肉瘤 (含 RNA 很丰富) 中用 0.001 M 磷酸缓冲液 (含镁离子为 0.0005 M)，pH 7.0 提取其核脱微粒，主要的为 83 S 颗粒，其中 122 S 与 60 S 的颗粒均较少。当镁离子浓度增至 0.0007 M 时，83 S 颗粒不变，到镁离子增至 0.002 M 时 122 S 的颗粒较多。在 0.005 M 镁离子溶液中只有痕迹的 RNA，当镁离子为 0.01 M 时 RNA 全部析出^[104]。在莫斯科召开的第五届国际生物化学会议上同一作者报导在 0.1M KHCO₃，pH 8.5 时从

Jensen 肉瘤中所得的核朊微粒为 65 S, 此时镁离子浓度为 0.0015 M, 高于此浓度则得到 83 S 的颗粒, 低于 0.0015 M 时则得到 55 S 的颗粒。65 S 颗粒含有额外的蛋白质约 20%, 当此蛋白质被去除时, 65 S 颗粒就减少了, 如将此额外的蛋白加回去, 又能得到 65 S 颗粒^[106]。前面已提到在小牛胸腺中有呈显核朊微粒聚集的状态, 并证明此现象和镁离子的存在与提取条件有关。如将镁离子全部移去, 就能导致这些颗粒的解离, 这种解离是不可逆的^[148]。由电子显微镜观察上述核朊微粒呈椭圆状, 有 300 Å, 250 Å, 200 Å, 100 Å 四种大小不同的颗粒^[147]。

总结上述的资料, Hoagland 比较了几种不同来源的核朊微粒的性质^[62]。认为在适宜的镁离子浓度之下, 可以得到较为均一性的核朊微粒(表 5):

表 5 几种不同来源核朊微粒的物理与化学性质^[61, 151]

	大肠杆菌	固氮菌	酵母	青豆芽	兔网织细胞	大鼠肝
沉降系数	70 S	86 S	80 S	80 S	78 S	78 S
分子量	2.8×10^6	—	4.1×10^6	4.5×10^6	4.1×10^6	—
直径, Å	200	250	240	350	340	170
RNA, %	59		42	40	50	40
蛋白质, %	41		58	60	50	60
可逆性解离的产物	51 S, 32 S	58 S, 39 S	60 S, 40 S	60 S, 40 S, 26 S		62 S, 46 S

(二) 不同大小核朊微粒的代谢活性 不同大小核朊微粒的代谢活性是否相同或不相同, 目前还缺乏足够的资料。Wagman 和 Trawick^[144] 从大肠杆菌中提出以 40 S 颗粒为主的核朊微粒, 他们用的提取液是 pH 7.0、离子强度为 0.1 的磷酸缓冲液, 而没有加镁离子。Dagley 和 Sykes^[85] 从大肠杆菌中提出了 40, 29, 20, 8, 5 S 的五种颗粒; Schachman, Pardee 和 Stainer^[117] 从各种细菌的提取液中亦得到 40, 29 和 5 S 的三种颗粒; 在这两篇报导中都用了镁离子, 他们的结果还和其他报导^[121, 61] 符合。Dagley 和 Sykes^[85] 观察到当细菌生长在含朊的培养基中时就产生较

高量的 40 S 顆粒,在无机培养基中进行培养时 40 S 顆粒就少些;在細胞分裂时 40 S 顆粒要多些,在靜止时期就少些。另一方面此 40 S 顆粒在 0.13~0.066 M 的磷酸緩冲液 (pH 7.0) 中于 37°C 下培养就消失了,如加入硫酸鎂又可制止其消失,磷酸浓度降低亦可減慢 40 S 顆粒的消失。McCarthy^[87]曾观察到大肠杆菌的培养基缺少鎂离子时核朊微粒在 24 小时内消失到仅为原来的 5%,重新加入鎂离子可使核朊微粒增加,而促进蛋白质合成的速度。Kennell 和 Magasanik^[68]也提出类似的报导,以后 Bowen 等^[15]也报导了細菌提取液中核朊微粒的大小与培养基中成分有关的类似的結果。从这些資料看来可以认为 40 S 顆粒在細菌細胞中代謝活性上具有重要的关系,而 40 S 的稳定性則受着鎂离子浓度的控制,虽然不能认为这是唯一的控制因素。如果根据 Webb^[152]所观察到細菌在缺乏鎂时可以合成蛋白质而不能分裂的现象,也許可以认为 40 S 顆粒中 RNA 是和細胞分裂过程沒有直接相联的关系。将黄豆根細胞的水提液进行电子显微鏡观察,可见其中核朊微粒的大小是随着細胞成熟而变小^[115],这和前面所述細菌細胞在生长較活跃时有較多的 40 S 顆粒出现的情况相似^[15]。

Tissieres 等^[136]以大肠杆菌中所分离出的核朊微粒进行氨基酸的并合实验,发现有一种 70 S 的顆粒,仅占总核朊微粒量的 10%,而其并合能力則比 30 S 与 50 S 顆粒要大 15~40 倍,因称之为“活跃的 70 S 顆粒”。这种活跃的 70 S 顆粒和通常的 70 S 顆粒不同,它并不由 50 S 与 30 S 所造成,因为它对鎂离子浓度的变化不敏感。最近 Bowen 等^[16]用压榨法从大肠杆菌及酵母中取得細胞液汁,經一系列的稀释测得其中含有 50 S 及 30 S 的顆粒,如在破碎的細胞中加入 0.01 M Tris 緩冲液 (其中含有 0.01 M 乙酸鎂),則能得到較大沉降系数的顆粒,因此作者认为在測定核朊微粒的沉降系数之前用鎂离子来稳定大的核朊微粒,未见能代表当时所存在着核朊微粒的天然状态。Tissieres 等^[136]还发现在大肠杆菌的体系中氨基酸的并合作用基本上的要求和大鼠肝相同。但是在前者鎂离子浓度对氨基酸并合程度的提高比較后者为

敏感。如在 $0.007 \sim 0.011 \text{ M Mg}^{++}$ 間可以获得最大的并合量，在 0.001 M Mg^{++} 时仅为其 7%。如用 0.011 M Ca^{++} 代替 Mg^{++} ，其活性只为后者的 10%。

由于金属离子的性质不同，使核朊微粒的氨基酸并合能力也有所改变，如表 6 所示。金属离子的性质对于使亚单位核朊微粒聚合为大的核朊微粒而恢复其氨基酸并合作用的能力还有一定的特异性。另一方面，不同来源的核朊微粒中所表现的金属离子的作用是不相同的。

表 6 不同二价阳离子使核朊微粒复合后的
氨基酸并合作用能力^[151]

青豆芽的核朊微粒	蛋白质析出的总量 (105,000g 60 分钟)	C^{14} 甘氨酸并合到核朊微粒上的 程度(cpm/10毫克蛋白质)
未經处理的核朊微粒	100	430
破碎的核朊微粒(去除 Mg^{++})	0	0
經 Mg 复合的核朊微粒	97	415
經 Ca 复合的核朊微粒	99	201
經 Mn 复合的核朊微粒	87	43
經 Co 复合的核朊微粒	97	393

最近 Takai 等^[131]在大肠杆菌中分离出 25 S 的核朊微粒，此种颗粒具有独特的性质：含蛋白质較多(75%)，而 RNA 的含量仅占 25% (与 30 S 及 50 S 比較，此两种颗粒中俱含 63% RNA 与 37% 的蛋白质)。此 25 S 颗粒的分子量为 9.2×10^5 。关于此种 25 S 颗粒为大颗粒的前身物問題，目前尚有爭論。由以上情况看来，核朊微粒颗粒的大小似与其代謝活性有相当的关系，但到目前为止这方面的資料还很不够，不能得到非常肯定的結論。

四、蛋白质生物合成中核朊微粒的特异作用

近年来不少研究的結果都承认蛋白质生物合成中的氨基酸并合作用是經历如下的过程：第一，氨基酸与三磷酸腺苷作用成为活化的氨基酸；第二，被活化后的氨基酸先和溶性核糖核酸(s-RNA) (或称轉运核糖核酸，T-RNA，或称接受体核糖核酸)

相結合，成为氨基酰基多核苷酸衍生物（或称氨基酰基核糖核酸）；第三，这个中間产物然后被轉运到核朊微粒上并与之結合；第四，氨基酸在核朊微粒上形成肽鏈，由核朊微粒上释放下来，成为溶性蛋白质，此反应在酵母、細菌、植物及动物組織中均已証实^[69, 72, 75, 79]；第五，然后 s-RNA 又恢复原状再与新的氨基酸結合，作用如前。参閱“細胞学进展”第五章。

核朊微粒是蛋白质合成的主要部位，它在肽鏈的形成中起着所謂“模板”的作用。应该可以认为一切特异的蛋白质的合成需要有特异的核朊微粒作为模板。

（一）氨基酸并合过程中核朊微粒的特异作用 上述氨基酸和 s-RNA 形成复合物并轉运到核朊微粒的过程是相当复杂的，需要一系列的酶的催化作用，目前已获得不甚純化的轉运酶制品^[51, 97, 132]，并且观察到巯基化合物可以保护这种轉运体系而不使其失去活性^[37, 66]，但也有报导在使用一种凝胶体 Sephadex 移去巯基激活物后，此酶制品于无巯基化合物的情况下仍具有活性。此外还需要 GTP 的参加，GTP 有刺激 s-RNA 轉运氨基酸到核朊微粒的作用^[132]。而二价阳离子如 Mg^{++} 、 Ca^{++} 、 Co^{++} 等都有促进核朊微粒上氨基酸的并合作用^[76, 107, 108]。

从特异性而言，在酵母或大肠杆菌的 s-RNA 上所接連的氨基酸不但能分別轉运到酵母或大肠杆菌本身的核朊微粒上去，也可以轉运到哺乳动物（如艾氏腹水癌細胞）的核朊微粒上去^[80, 97]。Zamecnik 等的实验中^[159]表明了 s-RNA 上的 AMP 末端是和标记氨基酸相結合，当轉运到核朊微粒上去时，AMP 就和核朊微粒上的 RNA 相結合，初时成直綫关系，到达高峰后成平行綫（见图 7）。用 P^{32} 标记的 s-RNA 进行实验，也可观察到有一部分 P^{32} 是很迅速地轉移到核朊微粒上去^[14, 63]。并且証明它們是結合得很紧^[11, 63]。这种結合状态可能是通过 s-RNA 和核朊微粒上的 RNA 的核苷酸上的氢鍵而形成的。由此可见 s-RNA 的特异性仅限于它和什么氨基酸相結合，而在轉运氨基酸到核朊微粒上形成肽鏈后形成特异的蛋白质的关键，則决定于核朊微粒

RNA的核苷酸排列,所以形成特异的肽鏈(进一步形成特异的蛋白质)是需要特异的核糖微粒作为模板的。

(二) 特异蛋白质合成中核糖微粒的特异作用 研究特异蛋白质的生物合成采用血紅素的合成作为对象最是便利。用完整而未成熟的网織紅血球(不含有細胞核而仅有約 80 S 的核糖微粒)^[89, 110], 或其无細胞体系^[119]

进行血紅素的生物合成, 的确能証明其中核糖微粒是此特异蛋白质合成的部位, 在此无細胞体系中需有下列几种組成: (1)核糖微粒, (2)网織紅血球裂解后上清液中“pH 5 沉淀”, (3) GTP, (4) ATP 能量产生体系, 和 (5) 氨基酸混合物^[119]。现如以豚鼠肝的 s-RNA 代替兔网織紅血球的 s-RNA, 則在上述兔网織紅血球合成血紅素的保温体系中氨基酸的并合效果仍是相同的^[2, 119]。

Lamform^[77]为了試驗不同来源的氨基酰基-RNA 并合到核糖微粒时 有无特异性的問題, 采用了网織紅血球的无細胞体系进行血紅素的合成实验。当用网織紅血球的核糖微粒与其“pH 5 沉淀”部分(其中含有氨基酰基-RNA), 和其“pH 5 上清液”部分, 以及 ATP 相混合保温时, 可以获得最高量的氨基酸并合。如用不同来源(如兔网織紅血球、豚鼠肝等)的核糖微粒, 或“pH 5 沉淀”, 或“pH 5 上清液”交叉組合, 进行实验, 則可得下述的結果: (1)网織紅血球的核糖微粒不論与网織紅血球的“pH 5 沉淀”或与豚鼠肝的“pH 5 沉淀”在一起保温都相等地起氨基酸并合作用而形成具有标记的血紅素, (2)省去“pH 5 沉淀”部分能使氨基酸并合减低 60~80 %, (3)“pH 5 上清液”的存在与否并不影响网織紅血球中核糖微粒上氨基酸的并合量, 但是只是网織紅血球的“pH 5 上清液”能促放射活性在溶性血紅素中的堆积, 豚鼠肝的

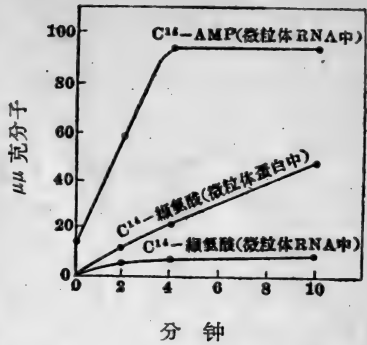


图 7 s-RNA 的 AMP 与核糖微粒的結合^[156]

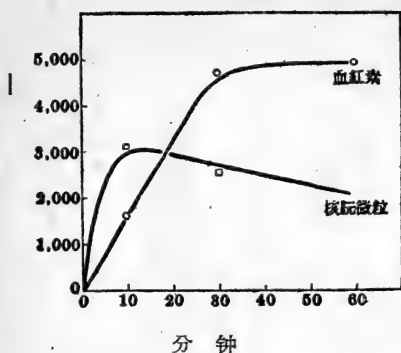


图8 C^{14} -亮氨酸并合到核糖微粒与血紅素上的時間曲綫^[77]

“pH 5 上清液”則无效。

从上述实验結果可见在血紅素的合成中“pH 5 沉淀”是不可少的，“pH 5 上清液”中似有一种因素能够促进合成的血紅素从核糖微粒上释放下来（这个问题还待进一步的肯定）。在上述体系中用已经标记了（ C^{14} -亮氨酸）的核糖微粒和 C^{12} -亮氨酸一起保温，可得到 C^{14} -

标记的溶性血紅素，由图 8 可见血紅素上的 C^{14} 标记是从核糖微粒而来，并依时间的延长而增加，核糖微粒上标记则随时间而减少。此外并证明了核糖微粒中所合成的仅是血紅素的一部分前身体。最近 Kruh 等^[74] 报导镁离子的浓度对于合成血紅素的前身体有影响，而钾离子则对于血紅素从微粒体中释放出来起作用。

以上所述仅着重于“pH 5 沉淀”和“pH 5 上清液”在合成血紅素中的作用，至于合成特异的血紅素（即其中氨基酸排定的特异性）则为核糖微粒所决定，有下列实验可资证明（表 7）：

表 7 兔和山羊网織紅血球中各組分的交叉試驗

	核糖微粒的来源	“pH 5 沉淀”的来源	“pH 5 上清液”的来源	合成血紅素的类型
1.	兔	兔	兔	兔
2.	兔	山 羊	兔	兔
3.	山 羊	山 羊	山 羊	山 羊
4.	山 羊	兔	山 羊	山 羊

Sohweert 等^[120] 进行了类似的实验，他们用兔或小鼠的网織紅血球的核糖微粒研究 C^{14} -氨基酸并合到紅血素，在实验的保温体系中除了有标记氨基酸、酶、s-RNA 及其他成分外，都加有兔和小鼠的血紅素，然后分别加入一种核糖微粒（兔或小鼠的）。保温之后将溶性蛋白质进行柱层析，使不同的血紅素分开，然后测其

放射活性。从图 9~10 可以看到在用小鼠的核阮微粒的实验中,小鼠血紅素的放射活性远較兔血紅素者为高; 在用兔核阮微粒的实验中情形适相反,图中最前面的峰的放射活性較高,这可能是卟啉珠蛋白部分,第二个高峰是小鼠紅血素,第三个高峰是兔紅血素。这些实验的结果显示出核阮微粒是具有特异性的; 某种来源的核阮微粒含有蛋白质合成的特异信息,而这具有特异信息部分应为

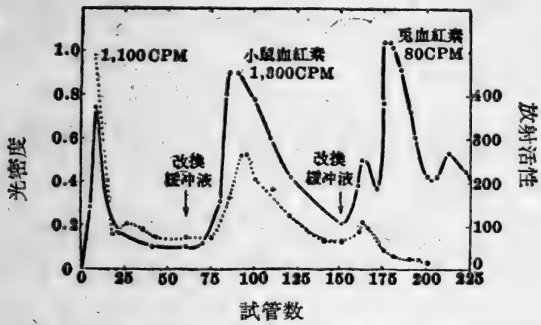


图 9* 用小鼠的核阮微粒的。 C^{14} -亮氨酸并合到两种紅血素的实验。·—·表示光密度, ····表示放射活性, 溶性蛋白用 IRC-50 进行柱层析, 其洗脱图如上。

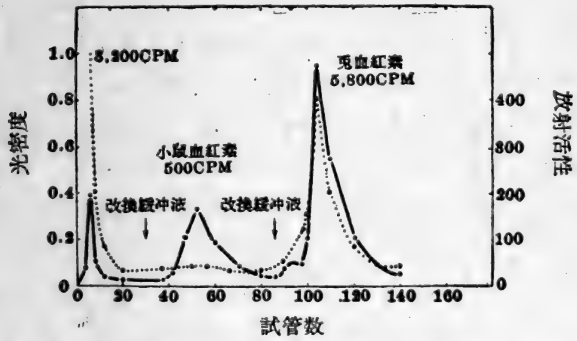


图 10* 用兔核阮微粒的。 C^{14} -亮氨酸并合到两种紅血素的实验。·—·表示光密度, ····表示放射活性, 溶性蛋白用 IRC-50 进行柱层析, 其洗脱图如上。

● 在两图中所示少量活性部分可能是假现象。因作者报告在对照实验中用标记的兔血紅素与不标记的小鼠血紅素混合, 然后行柱层析, 结果在小鼠血紅素部分仍发现有 3~4% 的活性。

RNA,正如病毒顆粒中 RNA 具有特异的感染性。

在上述實驗中還有 s-RNA 的存在,所以還不能排除 s-RNA 的作用。為了研究這個問題, Bishop^[8] 等又進行了下列實驗。他們將下列成分在 37° 保溫完畢後,將核糖微粒析出,蛋白質部分用硫酸銨沉淀,再用柱層析將蛋白質分離,測定放射活性。

1. (1) H³-亮氨酸-RNA (豚鼠肝)
(2) 核糖微粒(兔網織紅血球)
(3) 酶(兔網織紅血球) } 大部分的放射活性都集中在血紅素部分
2. (1) s-RNA (兔網織紅血球)
(2) 核糖微粒(兔網織紅血球)
(3) 酶(兔網織紅血球) } 大部分的放射活性都集中在血紅素部分

從以上實驗結果可看出無關的 s-RNA 加在保溫體系中也可形成血紅素,所以控制氨基酸排列者是核糖微粒。

3. (1) H³-亮氨酸-RNA (豚鼠肝)
(2) C¹⁴-亮氨酸-RNA (兔網織紅血球)
(3) 核糖微粒(豚鼠肝) } 較多 H³-亮氨酸出現在核糖微粒中
4. (1) H³-亮氨酸-RNA (豚鼠肝)
(2) C¹⁴-亮氨酸-RNA (兔網織紅血球)
(3) 核糖微粒(兔網織紅血球) } 較多 C¹⁴-亮氨酸出現在核糖微粒中

以上實驗也顯示在決定所合成蛋白質的性質是在核糖微粒, s-RNA 不起作用。

(三) 核糖微粒的特異作用與其中核糖核酸結構的關係 從前節所述蛋白質生物合成中核糖微粒的特異模板作用,而其特異性顯見是和核糖微粒中 RNA 的核苷酸排列有關。改變 RNA 模板上核苷酸的性質或其排列,應可改變所合成的蛋白質的性質,或是抑制了原來蛋白質的合成。例如以偶氮鳥嘌呤代替 RNA 中的鳥嘌呤,就能抑制含硫氨基酸併合到蛋白質中去^[87],而在另一實驗中還觀察到它有抑制門冬氨酸、精氨酸、酪氨酸、纈氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、絲氨酸、賴氨酸及組氨酸的併合作用;偶氮鳥嘌呤雖然降低了細胞質中的蛋白質合成,而在細胞膜上的併合作用

則不受其影响^[116]，也可见 8-偶氮鳥嘌呤的抑制作用有其特异性。5-氟尿嘧啶并合到 RNA 中后也产生类似的情况，它使大肠杆菌所合成的蛋白质中脯氨酸与酪氨酸的含量降低，而精氨酸的量升高^[57,94]，并使碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶的合成起变化^[19]。由于偶氮鳥嘌呤和 5-氟尿嘧啶对所合成的蛋白质结构的改变产生较为迅速的效应，可以认为这些非天然的核碱改变了核糖微粒中 RNA 的结构，从而改变了它的特异性。

(四) 细胞质中核糖微粒的特异性的来源 关于特异的核糖微粒控制特异蛋白质的合成的观点已简述如上，此特异核糖微粒的合成，也即此特异核糖微粒上的 RNA 的合成是受什么控制的呢？按一般观点，特异的 RNA 的合成受到 DNA 的控制。在最近文献中已有不少报导^[98,152] 阐明 RNA 的合成需要 DNA 为激发物，此外并有一些资料证明从各种细胞中分离出的 RNA，它的核碱组成和 DNA 核碱组成相似，并组成 DNA-RNA 的复合物^[13,49,118,137,157]，由此证明了有核糖核苷酸并合到 DNA 的末端的反应与催化此反应的酶的存在，此酶与 DNA 聚合酶完全不同^[79]。这一切很明显地说明 RNA 的信息来自 DNA。这种 RNA 与核糖微粒的特异性有什么关系呢？根据 Gros 等在进行大肠杆菌蛋白质合成的实验中发现有一种 RNA 不断地合成而随即降解^[63]，存在的时间很短暂，而其活性则很高，其核苷酸组成与 DNA 的相近似，认为这就是传递信息的 RNA，因此称为信使 RNA (m-RNA)。这个 m-RNA 是与核糖微粒相结合的^[111]，在提取核糖微粒时，如溶液中含有 1×10^{-2} M 的 Mg^{++} ，m-RNA 能保持和核糖微粒相结合， Mg^{++} 的浓度到达 1×10^{-4} M 时，m-RNA 即可从核糖微粒上脱落^[54,95]。前面曾提到在大肠杆菌中有所谓活泼的 70S 的核糖微粒^[134]，可以认为这种 70S 的颗粒上附有 m-RNA，所以能够进行活跃的蛋白质合成。有人观察到^[86] 在微生物的生长中核糖微粒既少降解也无合成；又有些报导^[98] 显示大肠杆菌被噬菌体感染后，其中宿主 DNA，s-RNA，核糖微粒 RNA 和 m-RNA 的合成均被抑制，只是噬菌体的 DNA 与其

m-RNA 的合成在进行着,所以就合成了噬菌体蛋白质,如此说来决定氨基酸排列的因素是更新率很快的 m-RNA,这个新的 RNA 分子附着在核糖微粒就构成了具有特异的核糖微粒。

近年来报导核糖微粒依靠 m-RNA 的附着可集聚一起成为集合体, Wettstein 称之为 ergosomes^[155],最大的集合体为 7 个 73S (单体)所构成。其他报导亦有称之为 polysomes。蛋白质的合成这些集合体上较在 73S 的原体上为活跃。如集合体解离为单体,蛋白质合成的活性即行降低^[95,128]。

(五) 细胞核中的核糖微粒与蛋白质合成 前面已经提到细胞核中也有核糖微粒的存在,细胞核中所进行的蛋白质合成过程也与在细胞质中进行的相似^[48,111],也需要氨基酸激活酶, s-RNA, ATP 及核糖微粒等。目前文献中报导的都以胸腺的细胞核为研究对象,在这种核的蛋白合成中必需有钠离子的存在,而在细胞质的蛋白质合成中则需要钾离子。更详细的合成机制研究还未见报导。

近来已有一些资料表明细胞核中存在一种能被迅速标记的 RNA,如在人的羊膜细胞中曾分离出一种 30S 的 RNA^[90],在胸腺细胞核中有一部分 RNA,它的核碱组成和 DNA 的近似^[121],又在大鼠肝细胞核的抽提液中所进行的 RNA 合成需有 DNA 的参加^[154], Hiatt 从大鼠肝细胞核制备的一种 RNA,表现具有 m-RNA 的特性^[90],因此近来有些学者认为 m-RNA 的合成是在细胞核中进行的,然后再释放到细胞质中,成为具有特异性的细胞质核糖微粒,这种观点尚须进一步的探讨。

关于 m-RNA 研究的进展,本书中另有介绍。

参 考 文 献

- [1] Abdul-Nour, B. & Webster, G. C., Exp. Cell Res., 20: 226, 1960.
- [2] Allen, E. H. & Schweet, R. S., Biochim. Biophys. Acta, 39: 185, 1960.
- [3] Aronson, A. I. & McCarthy, B. J., Biophys. J., 1: 215, 1961.
- [4] Ashikawa, J. K., Microsomal particles and protein synthesis (ed. Roberts, R. B.), p. 76, 1958.

- [5] Bailie, M. & Morton, R. K., *Nature*, **176**: 111, 1955.
- [6] Billen, D. & Volkin, E., *J. Bacterial.*, **67**: 191, 1954.
- [7] Birnstiel, M. L., Rho, J. H. & Chipchase, H. I. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 734, 1962.
- [8] Bishop, J., Leahy, J. & Schweet, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**: 1030, 1960.
- [9] Bishop, J., Faelukes, G., Schweet, R. & Russell, E., *Nature*, **191**: 1355, 1961.
- [10] Bishop, J. & Schweet, R. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **54**: 617, 1961.
- [11] Boemendal, H., Bosch, L. & Sluyser, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 454, 1960.
- [12] Bolten, E. T., Heger, B. H. & Ritter, D. B., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts, R. B.), p. 18, 1958.
- [13] Bonner, J., Huang, R. C. C. & Maheshwari, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**: 1548, 1961.
- [14] Bosch, L., Boemendal, H. & Sluyser, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 444, 1960.
- [15] Bowen, T. J., Dagley, S. & Sykes, J., *Biochem. J.*, **72**: 419, 1959.
- [16] Bowen, T. J., Dagley, S., Sykes, J. & Wild, D. G., *Nature*, **189**: 638, 1961.
- [17] Brachet, J., *Arch. Biol.*, **44**: 519, 1933.
- [18] Brenner, S., Jacob, F. & Meselson, M., *Nature*, **190**: 576, 1961.
- [19] Bussard, A., Naono, S., Gros, F. & Monod, J., *Compt. rend.*, **250**: 4049, 1960.
- [20] Butler, J. A. V., Cohn, P. & Simson, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **38**: 386, 1960.
- [21] Cassperson, T., *Cell growth and cell function*, 1950.
- [22] Chantrenne, H., *Ann. Rev. Biochem.*, **27**: 35, 1958.
- [23] Chao, F. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**: 64, 1961.
- [24] Chao, F. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**: 426, 1957.
- [25] Chao, F. C. & Schachman, H. K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**: 220, 1956.
- [26] Cheng, P. Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **53**: 235, 1961.
- [27] Claude, A., *J. Exp. Med.*, **66**: 59, 1937.
- [28] Claude, A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **39**: 398, 1938.
- [29] Claude, A., *Sci.*, **91**: 77, 1940.
- [30] Claude, A., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **9**: 263, 1941.
- [31] Claude, A., *Sci.*, **97**: 451, 1943.
- [32] Cohn, P., Simson, P. & Butler, J. A. V., *Biochem. J.*, **76**: 23 p, 1960.

- [33] Cowie, D. B., Spiegelman, S., Roberts, R. B. & Duerksen, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **47**: 114, 1961.
- [34] Crampton, C. F. & Petermann, M. L., *J. Biol. Chem.*, **234**: 2642, 1959.
- [35] Dagley, S. & Sykes, J., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts, R. B.), p. 62, 1958.
- [36] Davern, C. I. & Meselson, M., *J. Mol. Biol.*, **2**: 153, 1960.
- [37] Von der Decken, A. & Hultin, T., *Biochim. Biophys. Acta*, **40**: 189, 1960.
- [38] Dibble, W. E. & Dintzis, H. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **37**: 152, 1962.
- [39] Dintzis, H. M., Borsook, H., & Vinograd, J., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts, R. B.), p. 95, 1958.
- [40] Dunn, D. B., *Biochim. Biochem. Acta*, **34**: 286, 1959.
- [41] Dunn, D. B., Smith, J. D. & Simpson, M. V., *Biochem. J.*, **76**: 24 p, 1960.
- [42] Dunn, D. B., Smith, J. D. & Spahr, P. F., *J. Mol. Biol.*, **2**: 113, 1960.
- [43] Edelman, I. S., Ts'o, P. O. P. & Vinograd, J., *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 393, 1960.
- [44] Elson, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **27**: 216, 1958.
- [45] Elson, D. & Tal, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **36**: 281, 1959.
- [46] Elson, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **36**: 362, 1959.
- [47] Elson, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **36**: 372, 1959.
- [48] Frenster, J. H., Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci, US*, **46**: 432, 1960.
- [49] Georgiev, G. P. & Mantieva, V. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 153, 1962.
- [50] Gillchriest, W. C. & Bock, R. M., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts R. B.), p. 1, 1958.
- [51] Grossi, L. G. & Moldave, K., *J. Biol. Chem.*, **235**: 2370, 1960.
- [52] Gros, F., *The Nucleic Acids, III*, Chap. 38 (ed. Chargaff, E. & Davidson, J. N.), 1960.
- [53] Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C., Risebrough, R. & Watson, J., *Nature*, **190**: 581, 1961.
- [54] Gros, F., Gilbert, W., Hiatt, H. H., Attard, G., Spahr, P. F. & Watson, J. D., *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.*, **26**: 111, 1961.
- [55] Hall, C. E. & Slayter, H. S., *J. Mol. Biol.* **1**: 329, 1959.
- [56] Hamers, R. & Hamers-Casterman, C., *J. Mol. Biol.*, **3**: 166, 1961.
- [57] Handschumacher, R. E. & Welch, A. D., *The Nucleic Acids, III*, Chap. 39 (ed. Chargaff, E. & Davidson, J. N.), 1960.

- [58] Hart, R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **60**: 629, 1962.
- [59] Hers, H. G. Berthet, J., Berthet, L. & de Duve, C., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**: 21, 1951.
- [60] Hiutt, H. H., *J. Mol. Biol.*, **5**: 217, 1962.
- [61] Hoagland, M. B., *The Nucleic Acids*, III, Chap. 37, p. 360, Table III (ed. Chargaff, E. & Davidson, J. N.), 1960.
- [62] Hoagland, M. B., *The Nucleic Acids*, III, Chap. 37, p. 357, Table I (ed. Chargaff, E. & Davidson, J. N.), 1960.
- [63] Hoagland, M. B. & Comly, L. T., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **46**: 1554, 1960.
- [64] Hoagland, M. B., Keller, E. B. & Zamecnik, P. C., *J. Biol. Chem.*, **218**: 345, 1956.
- [65] Hogeboom, G. H., *J. Biol. Chem.*, **177**: 847, 1949.
- [66] Hülsmann, W. C. & Lipmann, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 123, 1960.
- [67] Huxley, H. E. & Zubay, G., *J. Mol. Biol.*, **2**: 10, 1960.
- [68] Kennell, D. & Magasanik, B., *Biochim Biophys. Acta*, **55**: 139, 1962.
- [69] Kihara, H. K., Halvorson, H. & Bock, R., *Biochim. Biophys. Acta*, **49**: 212, 1961.
- [70] Kihara, H. K., Hu, A. S. L. & Halvorson, H. O., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **47**: 489, 1961.
- [71] Korner, A., *Biochem. J.*, **81**: 168, 1961.
- [72] Korner, A., *Biochem. J.*, **83**: 69, 1962.
- [73] Krakow, J. S., Coulsogeorgopoulos, C. & Canellakis, E. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 639, 1962.
- [74] Kruh, J., Dreyfus, J. C., Rosa, J. & Schapira, G., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 690, 1962.
- [75] Lambory, M. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 719, 1962.
- [76] Lambory, M. R. & Zamecnik, P. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 206, 1960.
- [77] Lamform, H., *J. Mol. Biol.*, **3**: 241, 1961.
- [78] Lederberg, S. & Lederberg, V., *Exp. Cell Res.*, **25**: 198, 1961.
- [79] Lett, J. T. & Takahashi, W. N., *Arch. Biochem. Biophys.* **96**: 569, 1962.
- [80] Lipmann, F., Hülsmann, W. C., Hartmann, G., Boman, H. G. & Acs, G., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **54** (Suppl. 1): 75, 1959.
- [81] Lipshitz, R. & Churgaff, E., *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 545, 1960.
- [82] Littlefield, J. W., Keller, E. B., Gross, J. & Zamecnik, P. C., *J. Biol. Chem.*, **217**: 111, 1955.
- [83] Lyttleton, J. W., *Nature*, **187**: 1026, 1960.

- [84] Lyttleton, J. W., *Biochem. J.*, **74**: 82, 1960.
- [85] Lyttleton, J. W., *Exp. Cell Res.*, **26**: 312, 1962.
- [86] Maeda, A., *J. Biochem. (Japan)*, **50**: 377, 1961.
- [87] Mandel, H. G. & Altman, R. L., *J. Biol. Chem.*, **235**: 2029, 1960.
- [88] McCarthy, B. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **39**: 563, 1960.
- [89] McCarthy, B. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 880, 1962.
- [90] McCarthy, B. J. & Aronson, A. I., *Biophys. J.* **1**: 227, 1961.
- [91] McQuillen, K., *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* (ed. Butler, J. A. V., Huxley, H. E. & Zirkle, R. E.) **12**: 69, 1962.
- [92] Mendelsohn, J. & Tissierss, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**: 248, 1959.
- [93] Morgan, R. S., *J. Mol. Biol.*, **4**: 115, 1962.
- [94] Naons, S. & Gros, F., *Compt. Rend.*, **250**: 3527, 3887, 1960.
- [95] Noll, H., Staehelin, T. & Wettstein, F. O., *Nature*, **198**: 632, 1963.
- [96] Nomura, M., Hall, B. D. & Spiegelman, S., *J. Mol. Biol.*, **2**: 306, 1960.
- [97] Nathans, D. & Lipmann, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 126, 1960.
- [98] Okainoto, K., Sugino, Y. & Nomura, M., *J. Mol. Biol.*, **5**: 527, 1962.
- [99] Ochoa, S., Burma, D. P., Kröger, H. & Weill, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **47**: 670, 1951.
- [100] Osawa, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 244, 1960.
- [101] Palade, G. E., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts, R. B.), p. 36, 1958.
- [102] Palade, G. E. & Siekevitz, P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**: 171, 1956.
- [103] Palade, G. E. & Siekevitz, P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**: 671, 1956.
- [104] Petermann, M. L., *J. Biol. Chem.*, **235**: 1998, 1960.
- [105] Petermann, M. L., Hamilton, M. G. Balis, M. E., Samarth, K. & Pecora, P., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts, R. B.), p. 70, 1958.
- [106] Petermann, M. L., *Abst. Vth Intern. Congr. Biochem., Moscow, Sect. 3*, 79, 1961.
- [107] Pogo, A. O., Pogo, B. G. T., Littau, V. C., Allfrey, V. G. Mirsky, A. E. and Hamilton, M. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 849, 1962.
- [108] Raacke, I. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **34**: 1, 1959.
- [109] Raacke, I. D., *Fed. Proc.*, **19**: 345, 1960.
- [110] Rabinovitz, M. & Olson, M. E., *Fed. Proc.*, **16**: 235, 1957.
- [111] Rendi, R., *Exp. Cell Res.*, **19**: 489, 1960.
- [112] Risebrough, R. W., Tissieres, A. & Watson, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **48**: 430, 1962.

- [113] Roberts, R. B. (ed.), *Microsomal particles and protein synthesis*, p. VIII, 1958.
- [114] Roberts, R. B., *Microsomal particles and protein synthesis*, p. 84, 1958.
- [115] Robinson, E. & Brown, R., *Nature*, **171**: 313, 1953.
- [116] Roodyn, D. B. & Mandel, H. G., *J. Biol. Chem.*, **235**: 2036, 1960.
- [117] Schachman, H. K., Pardee, A. B. & Stanier, R. Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**: 245, 1952.
- [118] Schulman, H. M. & Bonner, D. M., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **48**: 53, 1962.
- [119] Schweet, R., Lamform, H. & Allen, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **44**: 1029, 1958.
- [120] Schweet, R., Bishop, J. & Morris, A., *Vth Intern. Congr. Biochem., Moscow, 1961, Sym. No. 2, Preprint No. 191*.
- [121] Sibatini, A., de Kloet, S. R., Allfrey, V. G., & Mirsky, A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**: 471, 1962.
- [122] Siegel, A., Singer, S. J. & Wildman, S. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**: 278, 1952.
- [123] Siekevitz, P., *J. Biol. Chem.*, **195**: 549, 1952.
- [124] Simkin, J. L., *Ann. Rev. Biochem.*, **28**: 145, 1959.
- [125] Spahr, P. F. & Tissieres, A., *J. Mol. Biol.*, **1**: 237, 1957.
- [126] Spahr, P. F., *J. Mol. Biol.*, **4**: 395, 1962.
- [127] Spiegelman, S., Hall, B. D. & Storck, R., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **47**: 1135, 1961.
- [128] Staehelin, T., Wettstein, F. O. & Noll, H., *Sci.* **140**: 180, 1963.
- [129] Strasdine, G. A., Hogg, L. A. & Campbell, J. J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 231, 1962.
- [130] Strittmatter, C. F. & Ball, E. G., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **43**: 57, 1954.
- [131] Takai, M., Oota, Y. & Osawa, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 231, 1962.
- [132] Takanami, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 85, 1961.
- [133] Takanami, M. & Okamoto, T., *Biochim. Biophys. Acta*, **44**: 379, 1960.
- [134] Tissieres, A. & Watson, J. D., *Nature*, **182**: 778, 1958.
- [135] Tissieres, A. & Watson, J. D. Schlessinger, D. & Halling-Worth, B. R., *J. Mol. Biol.*, **1**: 221, 1959.
- [136] Tissieres, A., Schlessinger, D. & Gros, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**: 1450, 1960.
- [137] Ts'o, P. O. P., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Ro-

- berts, R. B.), p. 156, 1958.
- [138] Ts'o, P. O. P., Bonner, J. & Vinograd, J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**: 451, 1956.
 - [139] Ts'o, P. O. P., Bonner, J. & Dintzis, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**: 225, 1958.
 - [140] Ts'o, P. O. P., Bonner, J. & Vinograd, J., *Biochim. Biophys. Acta*, **30**: 570, 1958.
 - [141] Utsunonniya, T. & Hess, E. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**: 100, 1961.
 - [142] Wade, H. E. & Morgan, D. M., *Biochem. J.*, **65**: 321, 1957.
 - [143] Wade, H. E. & Lovett, S., *Biochem. J.*, **81**: 319, 1961.
 - [144] Wagman, J. & Trawick, W. R., *Microsomal particles and protein synthesis* (ed. Roberts, R. B.), p. 11, 1958.
 - [145] Wallace, J. M. & Ts'o, P. O. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **5**: 125, 1961.
 - [146] Waller, J. P. & Harris, J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **47**: 18, 1961.
 - [147] Wang, T. Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 180, 1960.
 - [148] Wang, T. Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **53**: 158, 1961.
 - [149] Wang, T. Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**: 387, 1962.
 - [150] Wang, T. Y. & Wang, K. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **55**: 392, 1962.
 - [151] Warren, W. A. & Goldthwait, D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **48**: 698, 1962.
 - [152] Webb, J., *J. Gen. Microbiol.* **3**: 410, 1949.
 - [153] Webster, G. & Whitman, S. L., *Vth Intern. Congr. Biochem. Moscow*, Sym. No. 2, Preprint. No. 113.
 - [154] Weiss, S. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**: 1020, 1960.
 - [155] Wettstein, F.O., Stachelin, T., & Noll, H., *Nature*, **197**: 430, 1963.
 - [156] Work, T. S., *Developing Cell System and their control*, p. 226, 1960.
 - [157] Yčas, M. & Vincent, W. S., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **46**: 804, 1960.
 - [158] Yin, F. H. & Bock, R. M., *Fed. Proc.*, **19**: 137, 1960.
 - [159] Zamecnik, P. C., *Harvey Lectures, Ser. 54 (1958~1959)*, 256, 1960.

第六讲 遗传信息的传递者—— 信使核糖核酸

蔡 良 琬

中国医学科学院实验医学研究所

一、引 言

信使核糖核酸系由西文 Messenger RNA 译名得来，简称为 m-RNA，另有人命名为信息核糖核酸 (informational RNA)。从这两个名词意义上看虽不相同，但都表明这部分核糖核酸是具有信息传递的作用，因此被认为是与遗传有关的物质。

(一) m-RNA 的特性 m-RNA 与可溶性核糖核酸 (s-RNA) 及核糖微粒上的核糖核酸均不相同。m-RNA 有下列的特性：

1. m-RNA 与 s-RNA 及核糖微粒上的 RNA 的沉降系数不同，m-RNA 的沉降系数在 8~12S 左右。它的分子很不均一，在通常情况下与核糖核糖粒相連在一起。

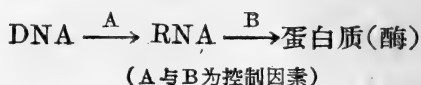
2. m-RNA 的更新较快，约为核糖微粒上的 RNA 更新速度的几十倍至百倍以上。其含量少，约占细胞中整个 RNA 含量的 2%。

3. m-RNA 分子中核苷酸组成比例，与该细胞中的脱氧核糖核酸(DNA)相对称。即如果以 DNA 中的胸腺嘧啶(T)与 RNA 中尿嘧啶(U)相对称，则 m-RNA 分子中腺嘌呤(A)，鸟嘌呤(G)，胞嘧啶(C)，及 U 的克分子比例与 DNA 分子中的 A, G, C, T, 的克分子比例一致。而 s-RNA 及核糖微粒上的 RNA 则均无此种对称的关系。

4. 据估計信使 RNA 的分子量在几十万以上,可能是遗传信息的传递者。

m-RNA 具有以上特性,因此一旦确定以后,就立即引起了世界生物化学工作者的重視。近来有关 m-RNA 的研究論文、綜述以及短評等发表很多,其研究的速度进展很快。为了能够系統的說明 m-RNA 在遗传及蛋白质合成上的作用,本文将首先就遗传信息传递的生物化学理論上的一些設想介紹如下。

(二) 遗传信息传递上的一些設想 遗传信息传递的理論基础,可用以下公式說明:



上列公式是过去发现 RNA 对蛋白质生物合成有密切关系后,即存在的一种假設。它表示遗传控制、蛋白质生物合成与核酸之間关系的一般图解。簡單的指出了 DNA 是遗传的物质基础,它对 RNA 的合成具有控制作用。RNA 可以控制蛋白质的合成(特别是酶蛋白)。因此也控制了細胞的代謝。另外在每个步驟中又都有一定的控制因素,所以整个过程是相当复杂的。近年来,对以上各个步驟都进行了許多研究,并获得較多的資料,結果是一再証实了公式的正确性。m-RNA 在上列公式中占有的地位,当然是在 RNA 的部分中,不过它并不能代表全部。但如果 m-RNA 确实有遗传信息的传递作用,它便将是其中最重要的部分。

(三) m-RNA 存在在遗传学上的根据 法国学者 Jacob 与 Monod^[16,17] (及英国学者 Brenner 等^[5]) 在遗传变异的研究中,也提出了 m-RNA 存在的可能。他們以微生物中某些蛋白质(酶)合成的改变来研究遗传变异問題。在他們研究大肠杆菌中半乳糖苷酶(galactosidase)、半乳糖苷渗透酶(galactoside-permease)及半乳糖乙酰化酶(galactoside-acytalase)等几种很相关的酶的生成与消失的誘导作用(inductin)及阻軛作用(repression)时,他們提出了以下問題,即蛋白质生物合成究竟发生在基因上还是

在胞漿中(核糖核朮粒上),是直接由基因复制而来,抑是通过特殊的中間物,如果說是在基因上,則誘導物与阻軛代謝物的作用将直接作用于基因。但是在細菌变异的研究中,誘導与阻軛作用所引起酶蛋白的生成与消失,同样也表现有显性及隱性的突变种,而且这些突变种的生成是相当迅速的。因此这种作用就不能用簡單基因的改變来解释。另外他們发现这些誘導与阻軛作用有多效性,即酶蛋白的生成与消失不是一种,而是一个酶体系。以上这些酶的生成与消失,在量上却总是一致的。有时还可以见到酶蛋白結構的形成,而无活性。如所生成的酶蛋白表现有免疫反应,但无酶的活性。由于以上所见到事实, Jacob 与 Monod 认为基因可能不是一个单位,而应分为結構基因与功能基因两部分,結構基因控制蛋白质合成分子中氨基酸的排列,而功能基因則控制蛋白质的合成过程。

Jacob 与 Monod 按照以上的假設,提出了誘導物与阻軛代謝物的作用,并不直接作用于結構基因,而是作用于功能基因上。更确切的提出可能是作用于結構基因外的某种遺传信息的传递物上。这种传递物的作用,就是将基因上的遺传信息帶到合成蛋白质的中心上(可能是核糖核朮粒上)。按照他們的論点出发,这种中間信息传递体的特性,應該是寿命短,有密碼复制的作用。而 m-RNA 的发现恰好符合他們的假設,但 Jacob 等的假說是只限于在微生物遺传学中,是否能够应用在广大的生物界,仍需經過許多实验来証实。而 m-RNA 在細胞中的存在,則是經過生物化学研究上的証实的。

二、信使核糖核酸的发现及其性质的研究

(一) 信使核糖核酸的发现 m-RNA 的发现是在 1953 年。当时 Hershey 等^[15] 利用了經過噬菌体 T₂ 感染的大肠杆菌研究核酸的生物合成,当他們用 P³² 做并合到核酸的实验时,他們发现了在极短促的时间內有部分 RNA 能发生并合作用。在討論中他們提出了这种 RNA 可能有特殊作用。以后在 1956 年 Volkin 与 Astrachan^[27,28] 也发表了相同的結果。并証明了有能迅速并合

作用的 RNA 含量很少,而其他部分 RNA 則并合得极慢。1958 年 Volkin 与 Astrachan^[40] 又利用噬菌体 T₇ 来感染大肠杆菌,也发现了这部分 RNA。同时他們分析了这部分 RNA 分子中核苷酸的比例,发现与大肠杆菌中的 RNA 不同,却与噬菌体 T₂ 或 T₇ 中的 DNA 相似(以 U 代替 T)。不过他們当时并没有命名,只提出这部分 RNA 可能是感染噬菌体后新合成的 RNA。以后 Volkin 也曾总结报导过其工作^[35,39]。1960 年 Ycás 等^[41] 又报导了在酵母細胞中也找到了这部分 RNA, 它的特性也是更新較快,而且其組成与酵母中的 DNA 相似。这样就引起了人們的重视。以后 Nomuna, Hall 与 Spiegelman^[35] 也发现在感染噬菌体 T₂ 的大肠杆菌中有此部分 RNA 存在,并命名 T₂-特异性-RNA (T₂-Specific-RNA)。1961 年 Gros 与 Haitt^[10,11,12] 又报导在未經感染的大肠杆菌中也有这部分 RNA 存在,并研究了它的某些理化性质。动物細胞中 m-RNA 的存在目前还只在艾氏腹水癌的細胞核中^[1] 及胸腺細胞中发现^[29]。最近文献中曾提到 Howard 与 Hiatt 即将发表肝脏中 m-RNA 的制备方法。

已知大肠杆菌为噬菌体感染后,其菌体自身的蛋白质合成停止。在菌細胞中大部或全部新合成的蛋白质是噬菌体的特异性蛋白质。因此这是一个良好的模型来观察給予特殊的 DNA 所引起的新蛋白质的生物合成。过去有人认为其关系也可能不是 DNA → RNA → 蛋白质,而是 DNA → 蛋白质。但上述 Hershey 等以及 Volkin 等的工作都証明了后一公式是不正确的。研究蛋白质生物合成,开始时都认为核糖核阮粒起着主要作用,甚至提出了一个核糖核阮粒能合成一分子蛋白质的假說。但很难解释的是,核糖核阮粒上的 RNA,其核苷酸組成比例經常是不与細胞中 DNA 的核苷酸的比例相对映。现在看来,m-RNA 却满足了这一关系(见表 1)。

(二) 信使核糖核酸的某些特性 m-RNA 在細胞中含量很少。Gros 等曾計算过大肠杆菌中 m-RNA 的含量。在該菌的細胞中核糖核阮粒上的 RNA 占总 RNA 的 80~85%, s-RNA 占总 RNA

表1 m-RNA 的化学組成分析

来 源		克 分 子 百 分 比				GC%	嘌呤/嘧啶	参考 文献
		C	A	U(T)	G			
感染噬菌体 T ₂ 的大肠杆菌	m-RNA	17	31	31	20	37	1.06	10
	T ₂ -DNA	17	32	32	18	35	0.98	
酵 母	m-RNA	20.3	31.6	29.4	19.1	39.4	1.02	41
	DNA	17.3	31.5	32.8	18.5	35.8	1.00	
	总 RNA	24.0	24.9	27.8	23.2	47.2	0.93	
大 肠 杆 菌	m-RNA	24.7	24.1	23.5	27.7	52.4	1.07	14
	DNA	26.0	24.0	24.0	26.0	52.0	1.00	
	总 RNA	24.3	25.0	19.7	31.0	54.3	1.27	
綠 脓 杆 菌	m-RNA	29.0	21.3	20.2	20.5	58.5	1.03	14
	DNA	32.0	18	18	32	64	1.00	
	总 RNA	22.3	23.1	23.6	31.0	53.3	1.21	

的10~15%。由此看来,m-RNA仅可能在5%以下。Gros等估計也只有2%左右。当然如果 m-RNA 是稳定的,則它将占总RNA中的很小一部分。但 m-RNA 更新迅速,故其量虽少,而新生的RNA 則应大部或全部是 m-RNA。如果合成一个蛋白质分子是 m-RNA 一次的功能时,則其生命時間將是很短促的几秒钟。

m-RNA 分子的大小是根据其沉降系数大小估計所得。Hayashi 与 Spieelman 及 Gros 与 Hiatt 等都进行了 m-RNA 的分离。m-RNA 含量极少,因此他們都是利用并合研究的方法进行的。Hayashi 与 Spiegelman^[14,30]发现 m-RNA 的沉降系数均在8S(与可溶性RNA,4S,及核糖核朮粒RNA,16S及23S皆不一致)。Gros 与 Hiatt 等也得到类似的结果,他們用 P³²及 C¹⁴-尿嘧啶核苷进行迅速的掺入研究(10~20秒),经过处理后,在分离核糖核朮粒时就发现有自由而迅速并合的RNA存在,其S值大致在14~16处。然后他用酚或去污剂脫去核糖核朮粒的蛋白质时,仍可以看到这部分有起迅速并合作用的RNA,不过其S值稍有改变,即减小至8S。Gros 与 Hiatt 认为这可能是由

于 m-RNA 容易受到酚或去污剂的作用,而引起破坏所致。其实
驗結果(见图 1, 2)。

进行迅速并合作用的研究比較困难。1961 年 Hayashi 与
Spiegelman 等^[14] 采用了“下降”培养的方法 (step-down cul-
ture), 即将在完善培养基中培养的細菌轉移到合成培养基中以抑

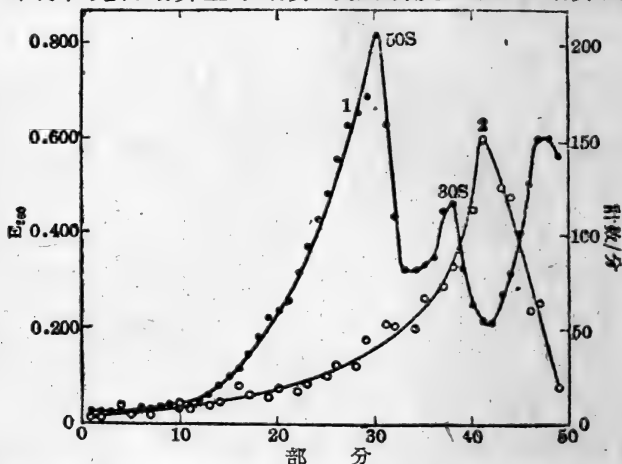


图 1 掺入 C^{14} -尿嘧啶的細菌提取液, 经过密度梯度的超速离心后,
其放射活性的分布。1. 光密度; 2. 放射活性。

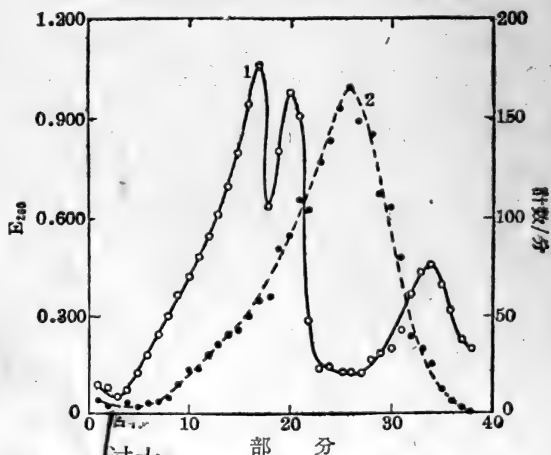


图 2 掺入 C^{14} -尿嘧啶的細菌提取液, 除去蛋白质后, m-RNA 的
沉淀曲线。1. 光密度; 2. 放射活性。

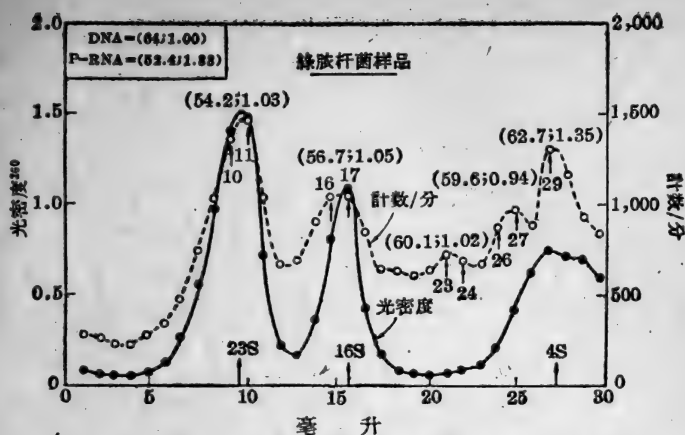


图3 掺入 P^{32} 后, 分离 RNA 的沉淀曲线, 及其化学组成分析。各部分 RNA 的组成 (% GC 嘌呤/嘧啶)。

制 RNA 的合成, 从而延长了这部分 m-RNA 的寿命。他们得到了可以在 3~15 分钟内进行并合实验的可能。Gros 与 Hiatt 还发现 m-RNA 更新迅速还不只表现在 P^{32} , 及 C^{14} -尿嘧啶核苷的并合实验中。当用 5-氟尿嘧啶进行并合作用时, 也可得到同样的结果。在 12S 部分发现有大量的 5-氟尿嘧啶存在。

m-RNA 分子很不均一。根据 Hayashi 与 Spiegelman 所得的 m-RNA 部分的分子中核碱的比例, 即可说明其不均一性 (见图 3)。此外 Gros 与 Hiatt 在分离 m-RNA 时发现, 在其分子中有一部分很容易与核糖核酞粒分离, 而另一部分则不容易与核糖核酞粒分离。即使在 Mg^{++} 浓度降至 $10^{-4}M$ 时, 仍有部分 70S 的核糖核酞粒不分解成 30S 及 50S。而在此部分核糖核酞粒上就附着 m-RNA 而且附着比较牢固。根据这一实验结果分析。也说明了 m-RNA 分子是很不均一。

以上实验都说明 m-RNA 与核糖核酞粒有着密切的关系。在核糖核酞粒的研究中, 应该提到的是在 1959 年 McQuidlen 等^[23, 24] 及 1960 年 Tissieres 等^[24] 都曾报导过在大肠杆菌中 70S 部分的核糖核酞粒是合成可溶性蛋白质的中心。而且最近还有人报导在 70S 核糖核酞粒上有可溶性蛋白质 (酶) 的合成。当 Mg^{++} 浓

度在 $10^{-8} \sim 10^{-9} \text{M}$ 范围内时,大肠杆菌中的核糖核朊粒多为 70 S,信使 RNA 即附着其上。当 Mg^{++} 浓度降至 10^{-4}M 时,70 S 核糖核朊粒部分开始分离形成 30 S 及 50 S。在此时不发生分离的 70 S 则是活性化的 70 S。Tissieres 等称之为活化 70 S。由于 m-RNA 很牢固的附着其上,也说明其功能与蛋白质合成有密切关系。

在核糖核朊粒上存在的 m-RNA 是自由的 RNA,它与核糖核朊粒中的 RNA 不同。由于其分子外部无蛋白质,故能够为胰的核糖核酸酶所水解。在 70 S 上附着的 m-RNA,究竟与蛋白质合成的关系如何,Gros 与 Hiatt 认为这部分 RNA 是蛋白质合成所必需的,在蛋白质合成后随着蛋白质的分离,也有相应的 m-RNA 分离出来。假使情况确实如此,则 m-RNA 与合成蛋白质的两种残基(核苷酸与氨基酸)就应有一定数学上的关系。这关系还待进一步研究。

m-RNA 代谢更新迅速。如果采用较长时间的 P^{32} 或 C^{14} -尿嘧啶核苷等的并合研究时,则很难发现 m-RNA 存在。因为这时 P^{32} 及 C^{14} -尿嘧啶核苷已经大量并合到核糖核朊粒的 RNA 及 s-RNA 上。根据这一事实,致使 Gros 等推想 m-RNA 的代谢去路,可能是转变成核糖核朊粒的 RNA 及 s-RNA。为了证明这种假设,他们用 C^{14} -尿嘧啶核苷对大肠杆菌做了迅速并合实验,然后立即将此菌转移到无放射性 C^{12} -尿嘧啶核苷的培养基中培养,观察 C^{14} -尿嘧啶核苷的去路。结果发现 m-RNA 部分的比活性消失,而核糖核朊粒 RNA 及 s-RNA 的比活性增加(见图 4 及 5)。这种改变是随着时间的增加而增长。此外在核糖核朊粒 RNA 各部分之间比活性的比例也随着变化,看来首先是在 16 S 处,以后再移至 23 S 处。此点也可能说明 23 S 部分是由两个 16 S 聚合而成。

既然 m-RNA 与蛋白质合成有密切关系,则 m-RNA 的代谢更新是否与蛋白质合成存在着一定的关系? Gros 等进行了一些相关的研究。他们采用了“下降”培养;加入氯霉素以及其他抑制蛋白质合成的方法,证明 m-RNA 的更新与蛋白质的合成无

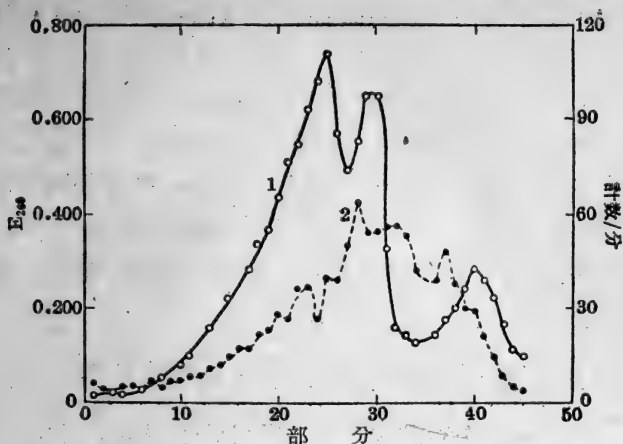


图4 掺入 C^{14} -尿嘧啶后的细菌，在无放射性的尿嘧啶培养基中培养两分钟后，分离出的 RNA 的沉降曲线。1.光密度；2.放射性。

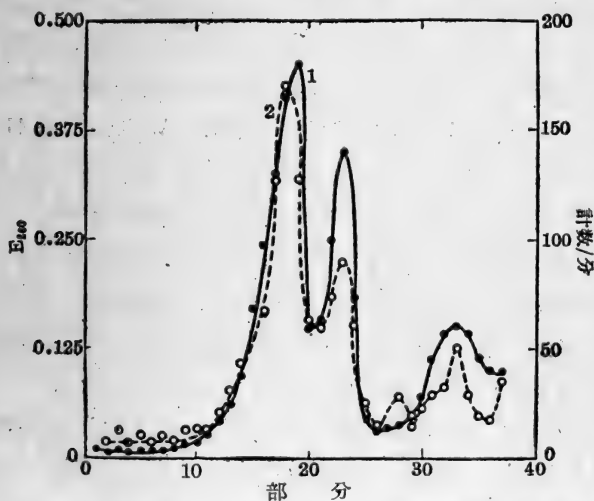


图5 掺入 C^{14} -尿嘧啶后的细菌，在无放射性的尿嘧啶培养基中培养20分钟后，分离出的 RNA 的沉降曲线。1.光密度；2.放射性。

关。但作者推测，在 m-RNA 与蛋白质合成的关系上可能存在着两种机制，即与 70 S 核糖核肮粒有可逆相连的 m-RNA 部分，其更新与蛋白质合成无关。而另一小部分牢固附着在 70 S 上的 m-RNA，其更新则与蛋白质合成有关。它只有在蛋白质合成情况下

才发生更新。Gros等提出如果大肠杆菌每秒钟每克細胞可利用1微克分子的氨基酸，則 m-RNA 的更新在 37°C 应为 10 秒左右。

根据以上材料看来，对 m-RNA 的理化特性还了解很少。这是由于目前分离大量的 m-RNA 还有一定困难。1962年 Bauty 等^[8]报导了应用 DNA-纖維素进行柱层析，可以分离出噬菌体 T₄-特异性 RNA (即 m-RNA)。但还必需克服 m-RNA 迅速更新破坏的特点，才有可能得到大量的 m-RNA，用以研究其理化特性。

三、信使核糖核酸的合成与相应脱氧核糖核酸的复制关系

(一) 核糖核酸由脱氧核糖核酸复制而来的理論与实验根据按照遗传信息传递的設想，m-RNA 应该是由 DNA 复制生成。1958年第四届国际生化会议上 Stent^[32]所做的报告概述了这一理論。并提出两个 DNA 鏈与一个 RNA 鏈相結合的三螺旋結構理論，这种三个核碱之間可能存在的氢鍵与 Watson 与 Crick 的理論相符合 (见图 6 与 7)。近年来的研究也証明了这种可能性。获得这方面成果，大体說，是由于以下三种方法的确立。

1. Doty 等^[9]用 DNA 溶液加热的方法解开 DNA 的双螺旋，而成单鏈的 DNA。然后将此溶液徐徐放冷处理，又可恢复双螺旋結構。采用这种方法，也可得到由不同来源 DNA 所組成的杂交双螺旋鏈。

2. 广泛采用了各种密度梯度的离心方法分开不同密度的核酸，特别是把杂交的 DNA 双螺旋与其他 DNA 分开，具有良好效果。

3. 酶促合成的高聚核苷酸在研究核酸結構上所获得的成就。1960年 Rich^[26]用酶促合成的多聚脱氧核糖核苷酸，与多聚的核糖核苷酸聚合成了人工的 DNA-RNA 的杂交鏈，完全符合于 Watson 与 Crick 的 DNA 双螺旋結構理論。其中有二杂交鏈，也有三杂交鏈。

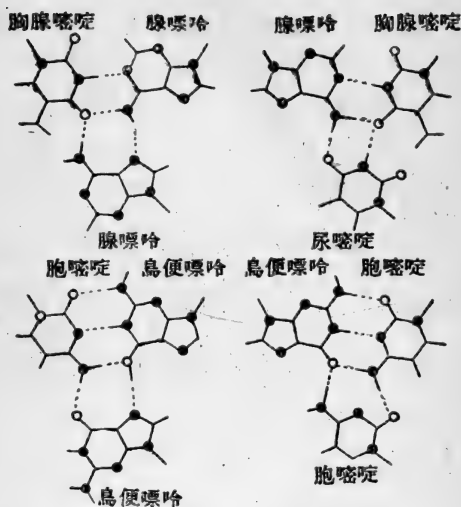


图6 在 DNA 双螺旋的沟槽处 (图上部) 形成的第三条多聚核糖核苷酸-蛋白质鏈(图下部)

图7 嘌呤与嘧啶三碱基間氢键相連的关系

1961年 Schildkrant, Marmur 及 Doty 等^[37] 用前1,2两种方法,获得了一些杂交的 DNA,如一条鏈为噬菌体 T_2 的 DNA,另一条鏈为噬菌体 T_4 的 DNA 等。他們根据实验得到一个結論,即只有在組成上相似的 DNA 才有可能形成杂交的 DNA。m-RNA 及相应細胞中的 DNA 恰好符合了这一关系。

过去采用酶促合成的研究方法,开始时并未发现 RNA 的合成需要 DNA。但近年来大量的証据証实了酶促合成 RNA 时,也需要 DNA 做为模板。这样合成的 RNA,其核碱比例与加入的 DNA 中核碱的比例相对称。由此更加說明了 m-RNA 的合成是通过相应 DNA 复制而来。不过复制过程以及酶促反应的研究还很少报导。

(二) 信使核糖核酸与相应脫氧核糖核酸的杂交鏈的形成以

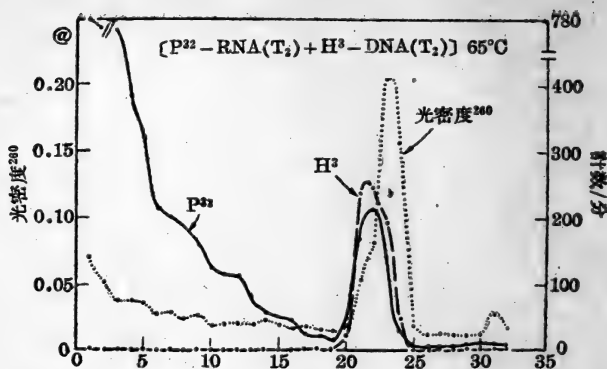


图8 65°C时噬菌体 T_2 的 DNA 与其特异性 RNA 杂交链的形成。C₈Cl-密度梯度离心分析。

及天然核糖核酸-脱氧核糖核酸杂交链的发现 m-RNA 与相应 DNA 的复制关系,首先是由 Hall 与 Spiegelman^[13] 所证实。他们用上述 DNA 螺旋解开与恢复的办法获得了噬菌体 T_2 -特异性 RNA (m-RNA) 与噬菌体 T_2 的 DNA 的杂交链。他们以含 H^3 的胸腺嘧啶核苷标记了噬菌体 T_2 的 DNA, 又以 P^{32} 标记 T_2 -特异性的 RNA。将此 DNA 与 RNA 混合, 并经过不同的加热处理, 然后以密度梯度的方法离心, 获得了此 DNA-RNA 的杂交链 (见图 8)。此外他们也采用了其他来源的 DNA 与此 RNA 混合做加热处理, 则未能获得结合。由于说明了 m-RNA 是可以由 DNA 复制而来, 而且只有相应的 DNA 才可以进行复制作用以上的 m-RNA。

既然 m-RNA 是由 DNA 复制而来, 在细胞中便也应该有天然的 DNA-RNA 杂交链存在, 以后 Spiegelman 等^[31] 又报导了他们获得了天然的 DNA-RNA 杂交化合物。他们所得到 DNA-RNA 杂交物, 也是在噬菌体 T_2 感染的大肠杆菌中。按此结果设想, 则在不同的生物细胞中也将有此同一物质存在。前述在艾氏腹水癌细胞核的染色体上所发现的 m-RNA^[11], 同样说明了有天然 DNA-RNA 杂交物存在的极大可能。同样 Schulman 等^[23] 最近也报导他们获得了这种天然的 DNA-RNA 化合物。

四、信使核糖核酸与蛋白质合成上的关系

(一) 核酸在蛋白质合成上的作用 已知特异性蛋白质的合成,是以核酸为模板,按照蛋白质合成的密碼复制学說,核酸中核苷酸的排列应该完全能够反映蛋白质中氨基酸的排列。利用血紅蛋白等已知氨基酸排列关系的蛋白质,来进一步了解与蛋白质合成有关的核酸,即 s-RNA 及核糖核朮粒 RNA 的特异性。发现 s-RNA 对合成蛋白质中氨基酸的排列无关。它的作用是携带已被激活不同的氨基酸,而不是密碼复制作用的模板。核糖核朮粒 RNA 在复制作用上似乎起了主要的作用,这一結果与 Tissieres 等提出的 70S 核糖核朮粒是合成可溶性蛋白质的中心的論点相吻合,至于 DNA 是否也影响蛋白质合成,从过去的实验材料中得到証据不多。近年来发现在研究蛋白质生物合成的无細胞酶促作用体系中,实际也有 DNA 参加作用^[9]。如果在整个蛋白质合成中,加入脫氧核糖核酸酶 (DNase),則蛋白质合成即受到抑制。由此証明了 DNA 对蛋白质生物合成有着密切关系。但究竟在这蛋白质生物合成体系中,此少量的 DNA 如何起着控制作用,在 m-RNA 被提出后 Matthaei 与 Nirenberg^[22] 才对这种蛋白质生物合成的作用做了研究。根据他們报导,在有 s-RNA、核糖核朮粒、pH 5 酶等的无細胞的蛋白质合成体系中加入 DNase 时,对氨基酸的并合作用确有明显的抑制作用。但他們比較了加入 DNase 与不加 DNase 的氨基酸并合作用,发现氨基酸的并合作用在反应开始阶段,并没有什么改变(见图 9),只有在經過一段時間后才发生抑制作用。因此作者提出氨基酸并合作用是与 DNA 存在有关,但可能更主要的是与 DNA 复制 m-RNA 有关。亦即与 m-RNA 的合成有关。由于反应开始时有一定的 m-RNA 存在,使 DNase 的抑制作用不能立即表现出来。

(二) 天然及人工信使核糖核酸在蛋白质合成上的作用 m-RNA 的存在及其性质的一些研究与推测,引起了研究蛋白质生物合成者的注意。Nirenberg 及 Matthaei^[24] 继以上工作即研究

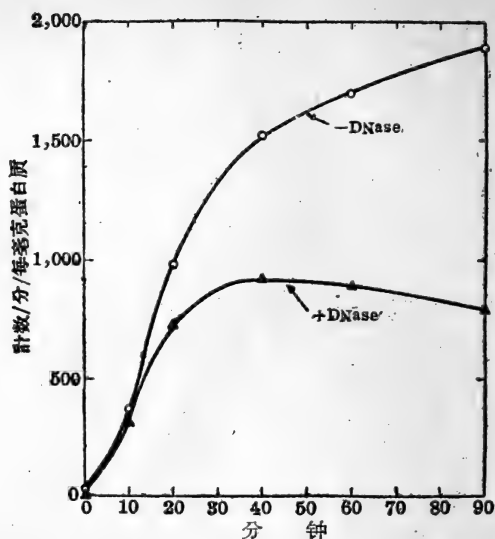


图9 DNase 对 C^{14} -L-缬氨酸掺入蛋白质中的影响

了天然及人工 m-RNA 的作用。他们把经过降解的核糖核肮粒的 RNA (约在 105,000 G 时沉降的) 加入到氨基酸并合作用的研究体系中, 发现有促进氨基酸并合的作用。证明了某些自由 RNA 的加入, 确实与蛋白质合成有关。同时他们又用以酶促合成的多聚核糖核苷酸作为模板, 即人工的 m-RNA, 来研究氨基酸的掺入作用, 得到了极其重要的结果。他们用多聚尿嘧啶核苷酸 (Poly U), 多聚腺嘌呤核苷酸 (Poly A) 及多聚胞嘧啶核苷酸 (Poly C) 等作为人工 m-RNA, 研究了 19 种氨基酸的并合作用, 发现 Poly U 对 l-苯丙氨酸的并合有异常明显的作用 (见表 2)。因此他们提出了可能尿嘧啶核苷酸是 l-苯丙氨酸的密码复制符号。但因他们采用的多聚核苷酸只是单一的, 故不能确定这密码关系究竟是 1:1 (核苷酸: 氨基酸), 还是 3:1 (3 个核苷酸: 1 个氨基酸)。

这种密码关系的发现, 一方面打开了研究蛋白质合成的密码复制学说的道路; 另一方面也说明了在 s-RNA 及核糖核肮粒

表 2 多聚核苷酸对苯丙氨酸掺入作用的影响

实 驗	加 入 物 质	計数/分/每毫克蛋白质
I	无	44
	+10 微克多聚尿嘧啶核苷酸	39,800
	+10 微克多聚腺嘌呤核苷酸	50
	+10 微克多聚胞嘧啶核苷酸	38
	+10 微克多聚次黄嘌呤核苷酸	57
	+10 微克多聚腺嘌呤-尿嘧啶核苷酸(2:1)	53
	+10 微克多聚尿嘧啶核苷酸 及 20 微克腺嘌呤核苷酸	60
	在零时去蛋白质	17
II	无	75
	+10 微克尿嘧啶核苷一磷酸	81
	+10 微克尿嘧啶核苷二磷酸	77
	+10 微克尿嘧啶核苷三磷酸	72
	在零时去蛋白质	6

RNA 之外,确实存在着另一种与遗传信息传递有关的 RNA (即 m-RNA)。

(三) 应用人工高聚核糖核苷酸对蛋白质合成的密碼复制作用的研究 蛋白质生物合成的密碼学說,已有許多年的发展历史,对密碼复制的关系也有許多不同的看法。现在应用較广泛是三組密碼学說^[8]。其学說的特点有四:

1. 在核酸分子中以三个核苷酸为一組,为一个密碼复制单位,可复制一个氨基酸。

2. 这种密碼复制单位的每三个核苷酸順序相連,在复制时沒有相錯的关系,1, 2, 3 核苷酸为一組, 4, 5, 6 为一組,而不是 1, 2, 3 及 2, 3, 4 等的相錯密碼关系。

3. 核苷酸与核苷酸之間沒有类似标点符号的物质,故在复制时是由一定方向开始分成 1, 2, 3 及 4, 5, 6 等核苷酸单位。

4. 这种密碼复制作用中还有“退化”现象,即有些特殊氨基酸往往能由不同的三核苷酸复制而来。反之一种三核苷酸組也有可能不仅复制一种氨基酸。

表3 大肠杆菌体系中各种多聚核苷酸对氨基酸掺入作用的特异性

氨基酸	相应密码关系,三核苷酸	参考文献
苯丙氨酸	UUU	[19]
牛磺氨酸	2U1G	
组氨酸	1U1A1C	
异亮氨酸	2U1A	
亮氨酸	2U1C	
赖氨酸	1U2A	
脯氨酸	1U2C	
丝氨酸	2U1C	
苏氨酸	1U2C 或 1U1A1C	
酪氨酸	2U1A	
缬氨酸	2U1G	
精氨酸	1U1C1G	
甘氨酸	1U2G	
色氨酸	1U2G	
丙氨酸	1U1C1G	[20]
门冬氨酸	1U1A1G	
麦氨酸	1U1A1G	
甲硫氨酸	1U1A1G	
门冬酰胺	1U2A 或 1U1C1A	

Nirenberg^[21] 与 Ochoa^[18,19,20] 实验室即应用了以上的密码复制学说,以酶促合成多聚核苷酸做为人工 m-RNA 进行了研究。计算得到了19种氨基酸密码复制的关系(见表3)。

不过这种密码复制关系还存在着缺点。例如(Chargaff^[6])就曾指出,根据一般蛋白质中氨基酸的含量比例计算,相应得到的核苷酸比例总是尿嘧啶核苷酸过多。因此使人无法相信核酸分子中含有这样多的尿嘧啶核苷酸。

但尽管如此,m-RNA 存在的理论,对密码复制的研究起了巨大推动作用,对解决密码复制关系,及生物的遗传变异的研究都打开了广阔的大门,目前对 m-RNA 研究与综合报导等文献为数很多^[2,4,86] Crick^[7] 更进一步以图解说明了 m-RNA 在合成蛋白

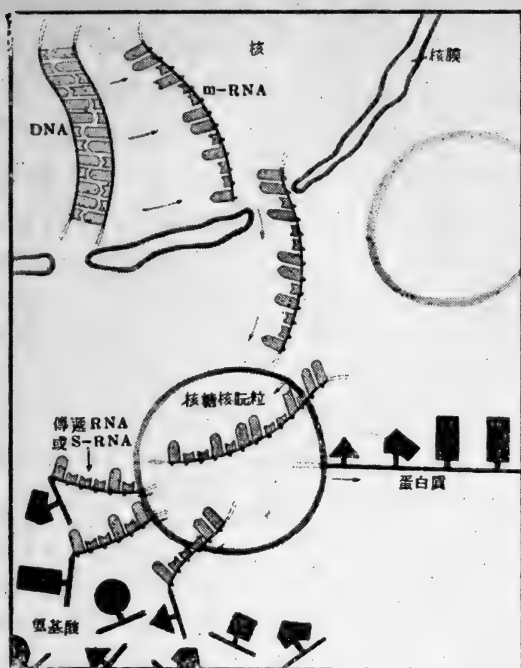


图 10 細胞中 DNA, m-RNA 及 s-RNA(传递 RNA) 在蛋白质生物合成上的作用

质的功能(见图 10)。这一图解清楚的说明了 m-RNA 目前研究的现状。

五、結 束 語

生物学中研究遗传、变异是一个极精細又复杂的问题。有关这方面生物化学的研究,目前以在蛋白质(酶)及核酸方面的工作較多,而且看来更多集中在研究遗传中蛋白质的生物合成问题。m-RNA 的发现,有力証明了蛋白质生物合成与核酸的遗传密碼复制的关系。当然目前看来研究所得的資料还很少,因此对遗传信息传递及密碼复制作用等问题的解释,部分还是处在推测、假說的阶段。要解决上述各关键,就必需对 m-RNA 做进一步提純,并研究其理化性质、代謝、更新、生物合成等问题,不过 m-

RNA 在細胞中含量很少，寿命短暫而且更新很快，因此分离提純 m-RNA 显然比分离提純 s-RNA 和核糖核朊粒 RNA 更为困难，为了满足新的工作，无疑会要求采用新的技术与方法。由 m-RNA 研究的现状看，它不仅是生物化学工作者感到极大兴趣的研究对象，而且也是整个生物学、特别是遗传学工作者企望及早解决的主要問題。我們相信，随着遗传密碼复制工作的迅速发展，m-RNA 的工作，在近 3~5 年內，也一定能获得更深入的研究資料，提供遗传机制研究工作的参考。

参 考 文 献

- [1] Георгиев Г. П. и Мантьева В. Л., *Вопро. Мед. Химии*, 8: 93, 1962.
- [2] Спирин А. С. и Смирнов В. Н., *Биофизика*, 7: 501, 1962.
- [3] Bauty E. K. F. and Hall, B. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 48:400, 1962.
- [4] Brenner S., *Cold Spr. Har. Sym. Quant. Biol.*, 26: 101, 1961.
- [5] Brenner S., Jacob F. and Meselson M., *Nature*, 190: 576, 1961.
- [6] Chargaff E., *Nature* 194: 86, 1962.
- [7] Crick F., *Discovery*, 23(3):3, 1962.
- [8] Crick F. H. C., Leslee Barnett F. R. S., Brenner S. and Watts-Tobin R. J., *Nature*, 192: 1227, 1961.
- [9] Doty P., Marmur J., Eigner J. and Schildkraut C., *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 46: 461, 1961.
- [10] Gros F., Gilbert W., Hiatt H., Attardi G., Spahn P. F. and Watson J. D., *Cold Spr. Har. Sym. Quant Biol.*, 26: 111, 1961.
- [11] Gros F. and Hiatt H., *Proc. 5th. Intern. Congr. Biochem., Sym. I*, 1961.
- [12] Gros F. and Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Risebrough R. W. and Watson J. D., *Nature*, 190: 581, 1961.
- [13] Hall B. D., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 137, 1961.
- [14] Hayashi M. and Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 47: 1564, 1961.
- [15] Hershey A. D., Dixon J. and Chase M., *J. Gen. Physiol.*, 37: 1, 1953.
- [16] Jacob F. and Monod G., *J. Mol. Biol.*, 33: 318, 1961.
- [17] Jacob F. and Monod J., *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem., Sym. I*, 1961.
- [18] Lengyel P., Speyer J. F. and Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 47:

1936, 1961.

- [19] Lengyel P., Speyer J. F., Bacilio C. and Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48: 63, 1962.
- [20] Lengyel P., Speyer J. F., Basilio C. and Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48: 282, 1962.
- [21] Martin R. G., Matthaei J. H., Jones O. W. and Nirenberg M. W., Biochem. Biophys. Res. Comm., 6: 410, 1962.
- [22] Matthaei J. H. and Nirenberg M. W., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47: 1580, 1961.
- [23] McQuidlen K., Roberts R. B. and Britten R. T., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 45: 1437, 1959.
- [24] Nirenberg M. W. and Matthaei J. H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47: 1588, 1961.
- [25] Nomura M. and Hall B. D., Spiegelman S., J. Mol. Biol., 2: 306, 1960.
- [26] Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 46: 1044, 1960.
- [27] Schildkrant C. L., Marmur J. and Doty P., J. Mol. Biol., 3: 1961.
- [28] Schulman H. M. and Bonner D. M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48: 53, 1962.
- [29] Sibatani A., de Kloet S. R., Allfrey V. G. and Mireky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48: 471, 1962.
- [30] Spiegelman S., Cold Spr. Har. Sym. Quant. Biol., 26: 75, 1961.
- [31] Spiegelman S., Hall B. D. and Storck R., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47: 1135, 1961.
- [32] Stent G. S., Proc. 4th. Intern. Congr. Biochem., Sym. VII, 200, 1958.
- [33] Tissieres A. and Hopkin J. W., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47: 2015, 1961.
- [34] Tissieres A., Schlessinger D. and Gros F., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 46: 1450, 1960.
- [35] Volkin E. Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Sym. VII, 212, 1958.
- [36] Volkin E., Fed. Proc., 21: 112, 1962.
- [37] Volkin E. and Astrachan L., Virology, 2: 149, 1956.
- [38] Volkin E. and Astrachan L., Virology, 2: 433, 1956.
- [39] Volkin E. and Astrachan L., The Chemical Basis of Heredity 686, 1957.
- [40] Volkin E., Astrachan L. and Countryman J. L., Virology, 6: 545, 1958.
- [41] Y'cas M. and Vincent W. S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 46: 804, 1960.

第七讲 具有生物活性的高分子

核糖核酸的提取方法及 其某些理化性质

黄 华 漳

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、引 言

核酸的生物作用早就为学者们所注意，但是用从组织或细胞提出的核酸进行实验，而得到和天然发生的相同的现象还是近几年的事。这些实验结果所以引起学者们的很大兴趣，因为这些核酸具有特异的生物活性，和组织细胞的核酸的生物作用显然不同，并且表现了遗传物质的特征，对于生物学的发展有重要意义。所以研究具有生物活性的核酸的提取与分离技术是一项重要的工作。

1956年 Gierer 与 Schramm^[47] 从烟草花叶病毒 (TMV) 提取出有传染性的核糖核酸 (RNA) 以后，许多作者报导在不同的病毒或组织中相继提出了具有生物活性的 RNA，兹按年代先后，列如表 1。

表 1 中除 Maassab 的流感病毒 RNA 还有争论^[86]，白血病人 RNA 及鸡 Rous 肉瘤 RNA 等也还需更多的试验作进一步的肯定外，其他动植物病毒的 RNA 的作用，多为已重复肯定的结果。

文献中提出了有生物活性的 RNA 的文章很多，表 1 只选择了最先报告及有代表性的工作，很多相同来源的 RNA，用不同方

表1 已报告具有生物活性的 RNA

年份	作 者	RNA 来 源	活性試驗系統	RNA 提取方法	文獻
1956	Gierer 及 Schramm	烟草花叶病毒	烟叶	冷酚法	48. 47
1957	Fraenkel-Conrat 等	烟草花叶病毒	烟叶	去污剂法	36
1957	Colter 等	Mengo 脑脊髓炎病毒感染的艾氏腹水癌細胞	小鼠脑, L-細胞組織培养	冷酚法	24
1957	Colter 等	脊髓灰白质炎病毒感染的地鼠脑及脊髓	小鼠脑	冷酚法	25
		西尼罗脑炎病毒感染的艾氏腹水癌細胞	小鼠脑	冷酚法	25
1957	Wecker 及 Schäler	东方馬脑炎病毒	鸡胚尿囊腔接种	冷酚法	122
1958	Alexander等	脊髓灰白质炎病毒	HeLa 細胞組織培养	冷酚法	4
1958	Cheng	Semliki 森林脑炎病毒	小鼠脑	冷酚法	18
1958	Huppert 及 Sanders	脑心肌炎病毒感染的Kreb II 腹水癌細胞	体内及体外的 Krebs II 癌細胞	冷酚法	66
1958	Brown 等	口蹄疫病毒	猪腎細胞培养, 小鼠脑	冷酚法	13
1958	Nojima	日本乙型脑炎病毒	小鼠脑	冷酚法	91
1959	Diener 及 Weaver	坏死环斑病毒	黄瓜叶	冷酚法	33
1959	Harrison 及 Nixon	烟草发响病毒 (Tobacco rattle virus)	法国豆	冷酚法	58
1959	Kaper 及 Steere	烟草环斑病毒	美国黑眼牛豆	热变性法	69
		蕪菁黄斑病毒	中国卷心菜	热变性法	69
1959	Reichmann 及 Stace-Smith	土豆X病毒	Chenopodium amaranticolor	盐酸胍法	94
1959	Rushizky 及 Knight	蕃茄丛矮病毒	烟叶	去污剂—酚合并使用法	96
1959	Welkie	黄瓜花叶病毒	黑牛豆	酚法	125
1959	Wecker	西方馬脑炎病毒	鸡胚尿囊腔, 鸡胚成纖維細胞	热酚法	123
1959	Franklin 等	小鼠脑脊髓炎病毒	小鼠脑	冷酚法, 热酚法	41

(續表)

年份	作 者	RNA 来 源	活性試驗系統	RNA 提取方法	文獻
1959	Ada 及 Anderson	Murray Valley 腦炎病毒	鸡胚絨毛膜	冷 酚 法 及 1% 脫氧胆酸盐 处理	1 3
1959	Ada 及 Anderson	登革 I 及登革 II 病毒, 泰勒氏(Theiler)GD VII 病毒	小鼠腦	酚法	2
1959	Sokol 等	Hypr 壁虱腦炎病毒	小鼠腦	冷酚法	109
1959	Sprunt 等	考克塞基(Coxsackie)A-7, B-4, B-5 病毒, ECHO 1 及 8 病毒	HeLa 細胞及人羊膜 細胞組織培养	冷酚法	115
1959	Maassab	流感病毒感染的絨毛尿囊膜	鸡腎組織培养	冷酚法	86
1960	Holland 等	I 及 II 型小儿麻痺病毒及考克塞基 B-1 病毒	HeLa 細胞組織培养	酚法(室温)	65
1960	Lacour 等	淋巴白血病人淋巴結	小鼠腹腔	冷酚法	78
1960	DeCarvalho	白血病人血, 骨髓及 肿瘤組織	人羊膜細胞組織培养	氰碳化物 法	30, 31
1961	Nakamura	登革病毒及日本乙型腦炎 病毒感染的小鼠腦	小鼠腦	冷酚法 热酚法	90
1961	Tufanov	鸡 Rous 肉瘤	鸡胚接种	冷酚法	119

法試驗的,未予列入。

本文根据上表中所列的方法,結合有关文献及我們實驗室的一些經驗,对有关 RNA 提取的方法作一簡單的介紹。

二、高分子核糖核酸的提取方法

具有生物活性的高分子 RNA 的提取方法大体上可归納成酚法、去污剂法、热处理法、盐酸胍法、氰碳化物法等几类:

(一) 酚法 这是目前最流行的重要方法,它导源于 Westphal^[126],他用酚与水的混合液来分离細菌的多糖时发现蛋白质溶于酚相,多糖和核酸則溶于水相。Kirby^[72, 78]正式利用这方法

来提取 RNA 及 DNA。Gierer 与 Schramm^[47] 用这一类方法,第一次提出具有感染性的 TMV-RNA,其后对此方法有了各种改良,就成为冷酚法、热酚法、皂土酚法等。

1. 冷酚法 以 Gierer 及 Schramm^[47] 的方法为代表,将 10% TMV 的磷酸盐缓冲液(pH 7.3)悬液,与等体积的水饱和酚液混合,强烈振摇 8 分钟,离心,分出水相(内含 RNA),将水相重复用水饱和酚提取两次,然后用等体积的醚,去除水相中的残余酚,如此重复 5 次,吹入氮气除去残余的醚。最后得到的 RNA 水溶液,可立刻进行感染性试验。全部提取工作在 5°C 下进行。

2. 热酚法 以 Wecker^[128] 的方法为代表。Wecker 用冷酚法提取东方及西方马脑炎病毒感染性 RNA 没有成功,而将酚的温度提高到 40° 或 50°C 进行(其他步骤和冷酚法相同),则能提取具有感染性的 RNA。后来日本人 Nakamura^[90] 用冷酚法和热酚法比对提取登革热病毒及日本乙型脑炎病毒的感染性 RNA 均得到同样成功的效果。Franklin^[41] 等用这两种方法从 Mengo 脊髓炎病毒中提取 RNA,亦得到同样的成功。

Wecker 认为在马脑炎病毒中提取 RNA,用冷酚法不能成功而要用热酚法才能成功的原因,可能是由于此类病毒的外壳含有 50% 脂质,此脂质在 5°C 的酚中不能溶解,要在温度提高到 40~50°C 时把含脂质的外壳溶解掉,才能将 RNA 释放出来。

又 Wecker 在提取东方马脑炎及西方马脑炎病毒 RNA 时,发现如先将组织磨成匀浆,再用酚提取则所得 RNA 量少而且无活性,如改用直接加酚,即先将酚加入组织中,再磨匀浆,再进行提取,则得到较好的结果,对这个现象的解释,认为在先匀浆后加酚的情况下, RNase 发生了作用,使 RNA 降解失活,直接加酚则可减少 RNase 作用的机会。Huppert 及 Sanders^[66] 在脑心肌炎病毒的感染性 RNA 提取中也遇到同样的问题,即用冷酚法不能提出脑心肌炎病毒的感染性 RNA,要用热酚法才能成功,而且在培养液的上清液中,能提到比病毒沉积物部分更多的感染性 RNA,但最近他们根据自己新的实验,怀疑原来的“冷酚不能取消病毒蛋

白外壳的抵抗，只有热酚才能成功”的推断。Bellett 及 Sanders 等^[9]在提取过程中，仿 Fraenkel-Conrat^[88] 等的方法，加入皂土，结果用冷酚也能提出脑心肌炎病毒的感染性核酸，而且活性和用热酚法一样高，在病毒沉积物中提取出比上清部分高 10 倍的感染性 RNA。

3. 皂土吸附法 Fraenkel-Conrat^[88, 108] 等以 100 毫克 TMV，悬浮于 4 毫升水中，加入 100 毫克处理过的皂土悬液，及 0.04 毫升 0.1 M EDTA (pH 7.0)，4 毫升 80% 的重蒸酚，在 25°C 搅拌 15 分钟，离心分出水相，再用 2 毫升酚搅拌，离心分出水相，用乙醚洗三次去酚，再以 2.5 体积乙醇及 3 M 醋酸(1 滴/毫升)沉淀 RNA，将沉淀再溶于水中。在冷的条件下，以 40,000 g 离心 2 小时去掉残余的皂土，再用乙醇沉出 RNA，或先用 1~1.2 M NaCl 沉出 RNA，再以乙醇沉淀。

这样制出的 RNA，其感染性比通常酚法提出的高 10 倍左右，蛋白质掺杂量降低到 0.03~0.05% (用 S³⁵ 测定) 或更少。RNA 的稳定性也增加了。Fraenkel-Conrat 等认为这是由于皂土把蛋白特别是 RNase 从 RNA 溶液中吸附掉的缘故。

在酚法的应用中，不同作者都有其不同的条件，在 pH 方面有用 pH 5, 6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 甚或更高的 pH 值；在缓冲系统方面，有用磷酸盐，氯化钠加磷酸盐，枸橼酸盐，氯化钠加枸橼酸盐，EDTA，Tris 等；在离子强度方面从 0.001 M EDTA 到 0.02~0.1 M 磷酸盐，及 0.14 M NaCl 等，在这不同条件下也提出了具有活性的 RNA。

至于酚本身，有人比较了不同厂牌批号的酚，得到不同的效果，所得 RNA 的活性有所不同，在某些试验中要用商品酚，而另一些试验中则要用重蒸酚，才能得到较好的效果。Fraenkel-Conrat^[60] 则用商品酚及重蒸酚作了分析比较，前者比后者含有更多的金属离子，因此在 RNA 制剂上混杂的金属离子量也不同，用商品酚提出的 RNA 的金属含量约比重蒸酚得到者高 10 倍(参閱表 2,3)。

表2 商品酚和重蒸酚的分析

(摘自Fraenkel-Conrat等: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 45: 315, 1959)

氧 化 物	商品(0.017%残渣) ^a 毫克/10 ⁴ 克酚	重蒸(0.0005%残渣) 毫克/10 ⁴ 克酚	重蒸后酚的 提純倍数*
Ca	170	1	170
Fe	13	0.1	130
Na	10	0.63	16
Cr	7	0.005	1400
Ni	4	0.035	114
Sn, Al	2	0.025	8
Mg	2	0.06	33
其他金属	≤0.3	≤0.04	
P	1020	25	40.8
Si	26	7.5	3
B	0.13	

* 提純倍数一栏,由作者折算得来,原表无。

表3 TMV-RNA 金属含量分析

(摘自 Fraenkel-Conrat 等: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A., 45: 315, 1959)

氧 化 物	用重蒸酚制备的 RNA金属含量(%)	用商品酚制备的 RNA金属含量(%)	含量比較 ^a
Ca	0.25	5.6	22×
Fe	0.01	0.09	9×
Cr	
Al	0.12	0.25	2×
Ni	
Mg	0.07	0.75	10×
Cu	0.001	0.004	4×
Sr	0.025	
Ba	0.005	0.013	2.6×
Sn	0.025	
Mn	0.025	

注: K, Na, P, Si, B 等未列入。

* 含量比較一栏由作者折算出来,原表无。

由于金属离子能影响 RNA 分子的二級結構，用重蒸酚所提出的 RNA 是无規則結構，商品酚所提出的 RNA 是規則排列的二級結構，但是这两种酚所提出的 TMV-RNA，在生物活性上却无显著差別。

Alexander^[5] 主张用重蒸酚，因为一些厂商，往往加入一些次亚磷酸作酚的保护剂而不加标明，这种保护剂却会破坏 RNA 的活性，他的經驗是加入磷酸盐緩冲液，或重蒸，或連續用水洗滌，均能去掉上述保护剂，目前已經很少有人用商品酚而不用重蒸酚进行提取的了。

酚的浓度有用 90%，80% 或水饱和酚（相当 70% 左右）。这些浓度的差別对 RNA 的活性似乎沒有显著的影响，但从不同的材料，对于提出 RNA 的含量或浓度有时会稍有差別，水的含量的多少是引起浓度差別原因之一。

除去残留的酚所用的乙醚，必須不含过氧化物，以免使 RNA 破坏，一般分析純的乙醚含有 0.001% 左右的过氧化物，必須預先去除。

(二) 去污剂法 Fraenkel-Conrat^[36] 的實驗室最早用这种方法提出活性 RNA。他以 Duponol C（即硫酸鈉十二烷酯，Na-dodecyl Sulphate）来提取 TMV-RNA。将 4 体积 1% TMV（内含 10^{-4} M EDTA）加热到 50°C，在此温度将 pH 調到 8.5，加入 1 体积 5% Duponol C，混匀，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 放 5 分钟后迅速冷到 20°C，加饱和硫酸銨到 33% 饱和，几分钟后，离心除去蛋白沉淀，将上清液放冰箱中过夜使沉出大分子 RNA，离心分出 RNA 沉淀，再溶于水中，加 2 体积乙醇再使沉淀，同时加入几滴 pH 5 的 3 M 醋酸盐緩冲液，使更易結絮沉出，重复乙醇沉淀一次，最后，复溶于水中，用超速离心去掉凝聚物及病毒，即得 RNA 的水溶液。

去污剂法中也有人不用 Duponol C 而用二甲苯磺酸盐（xylene sulfonate^[61]）的。

(三) 热处理法 或称热变性法。此法导源于 Cohen 及 Stanley^[28]，后为 Lippincott^[82]，Commoner^[28] 等人利用，并制

备出有感染性的 TMV-RNA^[83]。

此法先以 6 毫升 0.02 M 磷酸盐缓冲液(pH=7, 内含 0.13 M NaCl) 放入 125 毫升烧瓶中, 在盐水浴中加热到 98~98.5°C, 再加入 5~20 毫克/毫升的病毒悬液 3 毫升, 轻轻搅拌 1 分钟, 然后放入冰浴中冷 2 分钟左右, 以 2500 g 离心 5~8 分钟, 使大部变性蛋白下沉, 将上清液倾入 18 毫升(2 体积) 冷乙醇中, 30 分钟后, 以 2500 g 离心 15 分钟收集 RNA, 将沉淀再溶于冷蒸馏水中, 使其浓度达 100 微克/毫升左右, 再以 105,000 g 超速离心 1 小时, 去掉变性蛋白、残余 TMV 及凝集的 RNA。小心吸出上清液, 任何沉淀都不要。

Lippincott^[83] 的经验认为此法所用温度不能高于 98~99°C 的范围, 以免其活性降低, 除加热以外, 其他步骤均在 10° 以下进行, 这样得到的 RNA 其活性为 0.1~2%, 比一般方法提高 10 倍左右。

(四) 盐酸胍(guanidine hydrochloride)法 1951 年 Grinnan 及 Moshor^[57], Volkin 及 Corter^[120] 等均用盐酸胍来提取肝细胞浆的 RNA。1959 年 Reichmann 及 Stace-Smith^[94] 用来提取土豆病毒 X 的 RNA, 成功地得到感染性 RNA, 他们的方法如下:

将 0.5~1.0% 的病毒悬液加入足量的浓缩盐酸胍(再结晶的) EDTA (pH 8.4) 溶液, 慢慢加入使最后浓度达到 2.5 M 盐酸胍及 0.005 M EDTA。1 小时后, 在 4500 g 下离心, 以小量同样浓度的盐酸胍-EDTA 液洗沉淀两次, 再将沉淀混悬于水中, 加入 2 体积无水酒精, 及 2 滴 3 M 醋酸缓冲液(pH 5)。放置 30 分钟后, 在 4500 g 下离心分出沉淀, 再溶于水中, 在 75,000 g 下离心 90 分钟。将上清液对 500 体积的水透析过夜, 可得 70~90% 的 RNA。

(五) 去污剂-酚并用法 1959 年, Rushizky 及 Knight^[96] 用这种方法成功地从蕃茄丛矮病毒提取感染性 RNA。他们以 10 毫升约 25 毫克/毫升的病毒悬液, 及 1.6 毫升 10% 的硫酸钠十二

烷酯在室温加冰醋酸調 pH 到 4.1, 搅拌 2 分钟后, 原来乳白色的溶液变为清亮液, 再用碱将 pH 調到 6.1, 加入 10 毫升水飽和酚, 在室温搅拌 25 分钟后, 离心除去沉淀。用等体积乙醚重复洗水相三次, 离心将醚层分出, 加入 2 体积冷乙醇, 用加 0.1 毫升 pH 4.5 的 1 M 醋酸钠, 混匀, 在 6°C 放置 30 分钟, 离心, 将沉淀溶于 5 毫升冷水中, 成一混浊液, 以 114,000 g 离心 1 小时, 以去除少量变性蛋白。按上述步骤将上清液傾入含有醋酸钠的 12 毫升冷乙醇中, 在 6~8° 过夜后, 离心分出沉淀。此沉淀溶于水中, 即成接种用的 RNA 溶液。

(六) 氟碳化合物 (fluorocarbon) 法 氟碳化合物是属于乙烷的氟氯取代物的另一类去污剂, 一般作冷冻剂用, 称为氟利昂 (Freon)。通常根据含氟和氯的量而給以数字编号如氟利昂-112 (Freon-112)。这类方法应用到核酸提取上, 是导源于 Gessler^[45, 46] 用来純化病毒的方法, 他用 75 份氟利昂-112 与 25 份庚烷(重量/重量) 混合成的氟碳化合物, 除去非病毒的蛋白质而使病毒純化。后来 DeCarvalho^[30, 31] 利用类似的方法, 将白血病人的血、骨髓以及人的肿瘤(肺癌、乳腺癌等)組織, 提取出 RNA, 接种到人羊膜細胞中, 产生了細胞病变, 同时注入小鼠体内也分別产生白血病和相应的肿瘤。他的方法是以 1-氟-二氯-2-二氯-氟代乙烷 (1-fluoro-dichloro-2-dichloro-fluoroethane $\text{FCl}_2\text{C}-\text{CCl}_2\text{F}$) 作蛋白沉淀剂。将每份冷的血或瘤組織悬液 (将瘤組織去掉坏死部分, 剪碎, 混悬于 0°C 的 0.15 M pH 7.2 的 Sørensen 磷酸盐緩冲液或 McIlwaine 枸橼酸盐緩冲液中即成瘤組織悬液) 加入 1 份冷的氟碳化合物, 混合后, 以每分钟 45,000~50,000 轉, 速度研磨 10 分钟, 或以每分钟 70,000 轉, 5 分钟使成匀浆。作匀浆时以冰-丙酮浴保持温度在 0~4°C。然后, 以每分钟 1800 轉在 2°C 下离心 10 分钟。經過这一步之后, 匀浆分成三层。用冷的吸管将上清液取出, 移置冷的量筒中, 加緩冲液到原来体积, 再用氟碳化合物重复上述研磨成匀浆步骤, 直到水相和氟碳化合物之間再无沉淀出现为止。最后得到的水相, 在 0~4°C 用平均孔径为

0.6 微米的瓷过滤器 (FMB-52-03 Selas) 过滤, 滤液即为 RNA 溶液。

上述氟碳化合物, 是非极性去污剂, 在水中的溶解度只有 0.028%, 因此, 放置或低速离心均很易与水层分开, 自动地将核酸 (在水相中) 变性蛋白及去污剂本身分成三层, 操作方法较简易, 但这种方法不能将 RNA 和 DNA 很好分开, 在制剂中 DNA: RNA = 1:10。虽然“加入 RNase 能使制剂失活, 加入 DNase 则制剂的活性不减低”说明活性作用仍是由于 RNA 所引起的, 但在方法学上看含有如此多量的 DNA 仍嫌美中不足。

上述各种提取方法各有其优缺点, 对不同的对象, 其效果也不相同, 其中酚法用途最广, 对动植物组织、细菌、病毒等, 均有成功的报导, 方法简便, 能反复进行, 将蛋白掺杂量降到 0.5% 以下, 特别是皂土酚法, 更能成功地抑制 RNase, 获得较好的效果。

但酚法的缺点是有相当一部分的 RNA 跑到酚层中, 提取不出来。据 Milman^[88] 的报告, 在大鼠几种组织的不同亚细胞部分中, 分别有 2~20% 左右 (一般在 5~10% 左右) 的 RNA 不能用酚法提取出来。这些不能用酚法提取出来的 RNA, 其代谢活性却特别高, 以 P^{32} 并合作用来说, 比用酚法提取出来的 RNA 高 6~7 倍 (Milman^[88]) 或 10 倍以上 (Sibatini^[106])。

去污剂法所得的 RNA 产品, 一般蛋白质掺杂量较高, 适用范围也较窄, 只有少数成功的报导。盐酸胍法和热变性法也是这样, 先前的报导多是失败的, 只能获得降解了的 RNA。虽然 Lippincott^[89] 报导曾经用热变性法获得了感染性较高的 TMV-RNA (平均 1% 左右), 但感染性很不稳定, 而且仅有一两例的报告。

氟碳化合物法的应用, 多是关于人类组织及病毒方面的, 报告主要来自 De Carvalho 的实验室, 虽然他报告了氟碳化合物的结果比酚法的结果好, 并解释为可能酚法引起较多的降解^[32], 但是不能将 DNA 分开是一个显著的缺点。

总之, 目前所有方法还都不是完美无缺的。酚法的研究较多, 有关方面了解的也多些, 其他方法研究得还不多, 了解得更少, 还

有待更多的工作去闡明，和进一步創造出更完美的方法。目前在 RNA 提取的工作中，要达到象蛋白质那样能够結晶出来的水平，还有着相当的距离。特别是由于 RNase 的普遍存在，很难达到完全的绝对的抑制。所以在解决这个問題之前，要得到在生物活性方面及理化性质方面都能較好地重复的制剂就已經不很容易了。

三、核糖核酸提取过程中防止降解与变性的問題

在分子 RNA 的提取过程中，最重要的是怎样保持 RNA 的自然状态，及防止降解或变性，怎样除去杂质，提高純度。

能引起自然状态的 RNA 变性或降解的因素很多，有酶方面的，化学方面的，物理方面的，其中特別要注意的是 RNase 的抑制問題。茲分述如下：

(一) 核糖核酸酶的抑制 此种酶广泛存于組織中，甚至认为有 RNA 的地方就有它。上面列举的各种方法都是主要针对它的，酚、去污剂、热处理等法都是为了将蛋白质（包括 RNase）除去。一般是先使蛋白质变性，然后分离、除去，为了除去得更彻底，所以在酚法处理时，就有各式各样的补充。例如加入皂土便可得到更好的效果。最近 Kieckhöfen 及 Bürger^[71] 的研究认为酚不能取消 RNase 的活性，他們从酚层中把 RNase 提取出来，其活性仍和天然 RNase 相同。Huppert 及 Pelmont^[67] 对 RNA 降解的超速离心分析研究也証明了酚并不能取消 RNase 的活性，而只是在低浓度时（例如 10^{-1} 微克 RNase/毫克 RNA）能够部分地可逆地抑制它，当 RNase 的浓度相当大时，就是在酚饱和的溶液中，也还能继续分解 RNA。在酚法制备的 RNA 中，根据超速离心分析的估計約含有相当于 10^{-5} 微克 RNase/毫克 RNA，需加入皂土才能去除，皂土的加入在 Fraenkel-Conrat^[38] 及 Bellett^[9] 等的試驗中均得到比較好的效果。Boedtker^[12] 等最近报告了用聚硫酸乙烯酯（polyvinyl sulfate）抑制 RNase 在研究 RNA 結構方面也得到些較有意义的資料。Sela^[103] 提出了以酪氨酸-谷氨酸共聚体（tyrosine-glutamic acid copolymer 简称 T-G）抑制

RNase, Littauer 及 Sela 等^[84] 更以 T-G, 皂土及聚磺酸乙烯酯 (polyvinyl sulfonate) 等, 对 RNase 的抑制效果用超速离心分析作了比較, 証明上述三种物质, 对 RNase 均有較好的抑制效果。Roth^[93] 及 Shortman^[104, 105] 近几年一直研究組織中天然存在的 RNase 抑制剂也得到一些結果。这都意味着在 RNA 提取方面利用更好的 RNase 抑制剂有着更好的前景。

(二) 应避免的化学因素 强烈的酸和碱的作用能使 RNA 破坏。因此, 目前所有提取方法差不多都采用較温和的 pH, 以避免不必要的降解。

此外甲醛能使碱基的 $-NH_2$ 基团变为 $-N=CH_2$ (Schiff 基) 而鈍化, 亚硝酸能使 RNA 的 $R-NH_2 \rightarrow R-OH + N_2\uparrow + H_2O$ 改变, 因此失活, 溴化物、 $(CH_3)_2SO_4$ 也能使 RNA 鈍化, KIO_4 在弱酸中也能使 RNA 鈍化, 脘胺在中性 pH 能使 RNA 迅速鈍化。这些因素在 Schuster^[102] 的文章中均有較詳細的叙述可供参考。此外 Laskov^[79] 等认为在提取过程中使用 2-甲氧基乙醇去多醣也会引起 RNA 降解。

(三) 应避免的物理因素 輻射、X 綫、紫外綫照射、热的作用等均能引起 RNA 变性失活, 在 Schuster^[102] 的文章中也有很好的引述。

一般試驗室除热的影响容易碰到外, 其他因素是不易碰到的。

四、提高核糖核酸制剂純度的方法

在制备 RNA 过程中怎样除去掺杂物而又保持不使 RNA 的活性丢失是一个較重要的問題。掺杂物中最常见的有蛋白质及其衍生物、DNA (在細菌及动植物組織中常见, 在 RNA 型病毒則未发现有此类掺杂)、多醣类以及微量金属元素, 此等物质的掺杂很难彻底去除, 一般制剂多少有微量的掺杂。茲分述如下:

(一) 蛋白质掺杂問題 在最早 Gierer 和 Schramm^[48] 用酚法得到的 TMV-RNA 制剂, 以 Sakaguchi 反应測定 3 毫克 RNA 中的蛋白质含量低于 2%, 用双縮脲法測定 13 毫克 RNA

中的蛋白质含量則为 $<0.4\%$ ，以16毫克 RNA 用稀碱降解后經透析再进行酸水解，先测定氨基酸含量再計算蛋白质量則低于 0.25% 。

Fraenkel-Conrat 等^[86] 以去污剂法制备的 TMV-RNA 的蛋白质含量，以5.5毫克 RNA 用微量双縮脲法检查不出蛋白来，表示蛋白质含量的上限为 0.5% 。

这两个最早报告 RNA 有感染性的实验室的 RNA 制剂均不能証明无蛋白质掺杂，而且 RNA 的感染性只有原来病毒的 0.1% 左右，因此就引起了多方面的責难和反对，认为此种感染可以解释为残余的病毒顆粒夹杂在 RNA 制剂中的結果，不能解释为 RNA 感染性。为此曾引起了很大的爭論，并进行了許多新的試驗。Gierer^[54] 在1961年的国际生物物理會議中再一次肯定地指出蛋白质的掺杂，不能視作 RNA 感染性的来源。Белезерский^[8] 曾列举过过去曾被引述或是特別設計专为証明这一点的主要試驗。参加这种爭論的主要証据有：

1. Fraenkel-Conrat^[85] 用两种不同来源的病毒蛋白质及三种不同来源的病毒 RNA 作成六种不同的蛋白-RNA 組合，結果有五种組合在土耳其烟上呈病毒活性，而所得病灶的特征只和 RNA 来源的病毒相似，和蛋白来源的病毒却无关系，这表示病毒的活性，由 RNA 决定而不是由蛋白部分所决定。

2. Schramm 等^[97, 98] 及 Franklin 等^[89] 曾制出除无核酸外与 TMV 顆粒相似的病毒蛋白外壳，这种类似病毒的蛋白外壳并无活性，但 Fraenkel-Conrat^[84] 及 Lippincott^[82] 加入 TMV-RNA 后則有活性，若加入人工合成的多聚尿核苷酸(Poly U)或酵母 RNA 則无效^[59]，这也說明感染性 TMV-RNA 在 TMV 中的作用。

3. Laufer 等^[80, 81] 及 Ginosi 等^[55] 用 X 綫照射病毒的蛋白部分，使之破坏，結果并不影响活性，而照射 RNA 部分使 RNA 断鏈，則病毒失去活性。能使 TMV 鈍化的 X 綫剂量，与能使 TMV-RNA 鈍化的剂量相同，由此可见 TMV 的活性决定

于它的 RNA 部分,而不是蛋白部分。

4. Lauffer 及 Cartwright 等^[18, 17, 81] 研究用甲醛鈍化病毒的动力学,証明病毒鈍化曲綫与甲醛蛋白质反应曲綫无关,而当甲醛和核酸的氨基作用时,則产生鈍化作用,而且只要有一个核苷酸的氨基被甲醛作用,就能够引起鈍化作用。Gierer^[58] 等及 Schuster 等^[101] 研究 HNO_2 对 RNA 的作用,也得到类似的結果。这都可以說明病毒的感染性在核酸上而不在蛋白质上。

5. Bairden 等^[6, 7], Schuster^[100], Takahas'hi 等^[118] 及 Spirin 等^[110] 先后用电子显微鏡检查传染性 TMV-RNA 的制剂,都沒有发现有 TMV 顆粒,但将稀释到同样活性水平的 TMV 或甚至比 RNA 感染性还低 10 倍的 TMV 稀释液进行检查,則可清楚地见到 TMV 顆粒。

6. Gierer^[48, 49, 50, 51] 等, Cheo 等^[21] Schuster 等^[100] 以超速离心分析証明 180 S 的 TMV 有感染性, 20 S 的 TMV-RNA 有感染性,在 RNA 制剂中只有 20 S 部分有感染性,其他分子量較大(蛋白质部分)或較少(小分子 RNA)的組分,均无感染性。

7. 差不多每一篇感染性 RNA 的报告,都作出了 RNase 能迅速取消 RNA 的活性,而不能取消病毒活性的試驗。

8. Gierer 等^[47], Schuster 等^[100], Bairden 等^[6, 7] Fraenkel-Conrat 等^[36] 均报告过抗 TMV 血清能迅速将 TMV 鈍化,但对 TMV-RNA 則无作用,也証明 RNA 制剂的活性是在 RNA 本身,而不是在蛋白质上。

9. Gierer 等^[47], Fraenkel-Conrat 等^[36] 及 Spirin 等^[110] 均报告过感染性 RNA 溶液会逐渐失去感染性,而 TMV 溶液相对地稳定得多。这也說明两者是不一样的。

10. Fraenkel-Conrat^[37], Schramm^[99], Siegel 及 Ginosa 等^[107] 分別报告了在感染过程中, RNA 引起的感染,其潜伏期較短,而 TMV 引起的感染,則潜伏期較长,說明完整的病毒顆粒和 TMV-RNA 有不同的感染过程。

11. Colter^[24, 25] 等报告感染性 RNA 能被 1 M NaCl 沉淀

出来,而 TMV 則用 1 M NaCl 沉淀不出感染性部分。

12. Holland 等^[63, 64] 发现小儿麻痹病毒、柯薩奇 (Coxsackie) A-9 病毒、柯薩奇 B-1 病毒、ECHO-8 病毒等对从猪、兔、荷兰猪、小鼠、地鼠、小鸡等分出来的細胞,并无感染力,但从上述病毒分离出来的 RNA 却对这些細胞有感染力。

13. Schuster 及 Schramm^[100] 等 Fraenkel-Conrat^[37] 等曾用酚法反复提取,除去蛋白,使 TMV-RNA 制剂只包括有很少量的两三种氨基酸,而且 TMV 蛋白中含量最多的亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸、苯丙氨酸等重要氨基酸都没有在 RNA 制剂中发现,与稀释到具有同样感染性水平的 TMV 溶液对比則后者有 18~19 种氨基酸存在。

以上种种,已經很有力地說明 RNA 制剂的感染性存在于 RNA 本身而不是由于可能残留的蛋白质引起的,尽管如此,但仍有人怀疑 RNA 的作用。1959 年 Knight^[74] 用 S^{35} 标记的 TMV 試驗,証明 RNA 制剂中含有 0.2% S, 是从 TMV 的蛋白部分来的,因此认为不能免除蛋白质的作用。

1961 年 Fraenkel-Conrat^[38] 在以酚法提取 TMV-RNA 过程中,加入皂土吸附蛋白质和抑制 RNase。結果使 RNA 制剂中 S^{35} 的含量降低到相当于 0.02% TMV 蛋白质的水平。而且这一含量非常低的 S^{35} , 不能再乙醇沉淀, NaCl 沉淀等方法处理使之减低,若加入蛋白部分重組 TMV 时,則 S^{35} 几乎全部被置换。这一点 S^{35} 似乎是以某种形式和 RNA 結合的东西,而不是掺杂的蛋白质。再者經皂土处理的 RNA, 其感染性提高 10 倍左右,約相当同重量 TMV 的 20% 的感染性,亦即相当于含有同样 RNA 量的 TMV 的 1% 的感染性。無論如何 0.02% 的 S^{35} 蛋白质,不能解释为上述活性的来源,从而反駁了 Knight 的試驗。

Gierer^[54] 曾总括地引述蛋白质的掺杂不能作为 RNA 感染性的来源,分离出来的 RNA, 当其蛋白质掺杂量低于每个 RNA 分子配有一个蛋白质亚单位的数值时,其感染性并不降低,而且抗病毒蛋白的抗血清,不能以任何方式使純化了的 RNA 发生鈍化,

都証明了在 RNA 制剂中沒有值得重視的蛋白质掺杂。

关于蛋白质掺杂的除去方法除使用前述提取方法中所提到的去蛋白质試剂外，还有用乙醇及 1 M NaCl 反复沉淀，也能帮助清除蛋白质及多醣类掺杂物。

关于蛋白质掺杂量的检查方法，最常用而又較方便的样品用量少的有微量双縮脲法^[62]、酚試剂法^[85]等。特别是酚試剂法的应用更广，一般适用于測定 0.5% 以下的蛋白质掺杂，样品用量也在 1 毫克左右，灵敏度也远較双縮脲法为高，Ramachandran 和 Fraenkel-Conrat^[93] 曾有专文論述，虽然此法較其他方法好得多，但仍存在着以下缺点：

1. RNA 的組成成分能引起相当于 0.095% 蛋白质的內源顏色反应^[93]，这个数值有时甚至高到 0.43%^[88]。
2. 酚法提取时残留的酚也起顏色反应。
3. 其他带酚基的物质包括含有酚基的氨基酸在內均能引起顏色反应。
4. 不同蛋白质的成色率有所不同，要用相同的蛋白质作标准^[85]。

最近羅馬尼亚的 Blazsek 和 Bukaresti 报告^[11]用极譜法測—SH 基，可測得 800 γ RNA 中 0.3% 的蛋白质含量，用微量管时，甚至可測出 40 γ RNA 中的 0.3% 的蛋白含量。这也是新提出为測定 RNA 蛋白掺杂量的方法之一。

目前，除特別专为除去蛋白的試驗外，一般感染性 RNA 制剂中，蛋白质掺杂量多在 0.5% 左右或更少，也有用双縮脲法阴性表示的，由于双縮脲法灵敏度較低，千分之几的掺杂量可能显不出来，所以阴性結果不能視為絕對沒有蛋白。

(二) 其他掺杂物 在細菌及动物組織中提取 RNA 时多醣类的掺杂頗多。除去的方法，对大鼠肝脏一般采用饥饿 24 或 48 小时的方法，以减少糖元含量，但对掺杂在制剂中的糖元的除去，仍无十分妥善办法。Kirby^[72]曾报告用二甲氧基乙醇除去糖元。随后 Laskov^[79]却认为此种試剂能使 RNA 降解。糖元掺杂量，一

般少于百分之几,用 1 M NaCl 沉淀的 RNA 制剂可减少到少于 1% 的程度。由于还未发现多糖类对感染性有无影响,所以在感染性 RNA 的报告中,还未有很多作者报告过多糖掺杂量,只在 s-RNA 的报告中才有较多的注意。测定糖元掺杂量的方法一般采用蒽酮法^[68]或将 RNA 水解并透析后再测定葡萄糖的含量。

DNA 的掺杂,在 RNA 型病毒中,目前还不存在,只在带细胞核的动物组织和细菌等对象中才有这个问题。在利用动物组织提取 RNA 时,去 DNA 的方法,一般采用先去细胞核的办法,以每分钟 3000 轉离心将核除去后再行提取。此外 Georgiev^[44]等在酚法中利用 pH 来控制,使 DNP 留在酚和水中間层中不放出 DNA。这样处理得到的 RNA,沒有发现有 DNA 掺杂。Franklin^[40]等則用 pH 5 的酚液使 DNP 分开,又 Laskov 未經特殊处理的酚法 DNA 掺杂量也少于 0.1%^[79]。

DNA 掺杂的测定,一般用二苯胺的办法,但由于方法本身的限制須用較多的样品,想用少量的 RNA 样品测定 0.1% 以下的 DNA 掺杂就比较困难了。

其他多种微量金属离子存在于 RNA 制剂中,目前还无完全清除的方法,也还不能确定他們是否参与 RNA 的組成。Wacker 和 Vallee^[121]分析了多种来源的 RNA 样品,一般均含有較大量的 Mg 及 Ca (每克 RNA 約为 300~2000 微克左右),他如 Sr、Ba、Al、Cr、Mn、Fe、Ni、Zn 等均有存在。这些金属离子大部分可用 EDTA 等螯合剂去掉。

(三) 几类除去掺杂物的方法

1. 透析 透析一般能把低分子物除去,但是对活性的 RNA 來說如果条件不合适会引起降解和失活。Möller 及 Boedtker^[89]报告 TMV-RNA 对 0.001 M EDTA 或 0.01 M Tris 緩冲液, pH 7.5,透析 3~4 日也不降低 RNA 的 $S_{20,w}$ 值,大肠杆菌 RNA 在 pH 7 透析后,却产生降解, $S_{20,w}$ 降低,此种降解在 0.01 M Mg^{++} 的存在下可以防止。

Cheng^[20]报告人羊膜細胞的 31 S 的 RNA,在透析时发生

降解，20 S 的 RNA 則不降解。

似乎对不同对象，其透析結果不一定相同。1962 年 Boedtke 等^[12]报告 TMV-RNA 及大肠杆菌核糖微粒 RNA，在 pH 7.6 的 0.01 M Tris 緩冲液等几种条件下进行透析，引起降解。但加入聚硫酸乙烯酯抑制 RNase 后，虽延长透析到一星期之久，也沒有发生降解现象。因此将透析过程中引起的降解解释为样品中杂有 RNase 的緣故，与前述 RNase 不完全为酚抑制的，不易完全除去的試驗結合起来看，Boedtke 等的见解，似乎是比較可信的。

2. 柱层析法 近年許多作者报告利用柱层析的方法可将 RNA 純化，还可将 RNA 的各种組分分离，但結果往往不能統一，特别是对高分子 RNA 的保持不降解，常有相反的意见。例如：

(1) Möller 及 Boedtke^[89]报告将 TMV-RNA 通过 Na-Amberlite 1 R-120 阳离子交换柱除去二价金属离子后其 $S_{20,w}$ 无变化，大肠杆菌 RNA 則对 pH 5.2 的交换柱不发生降解，对 pH 7 的交换柱，則产生不可逆的降解。Cox 等^[29]报告含有 17 S 及 28 S 两組分的 RNA，經過 Amberlite IR-120 或 IRC-2 的阳离子交换柱后，17 S 組分由 25% 提高到占总量的 50%。这也表示有部分降解的产生。

(2) Goldthwait 及 Kerr^[56]报告 RNA 經過 Ecteola 交换柱时由于吸附作用引起 RNA 的降解。DEAE 纖維素柱也引起降解。

(3) Burness 及 Vizoso^[15]用脑心肌炎病毒 RNA 制剂，通过磷酸鈣层析柱，高聚 RNA 在过柱后得两个峰，和超速离心图谱上的两个峰相当。以之再作超速离心，其 S 值并不降低。作生物活性試驗，也沒有失去活性。这样的結果說明高分子 RNA 对磷酸鈣柱是很稳定的。过柱后，可将不同的 RNA 組分分离开来，这是很难得的优点。

Brown 等^[14]最近也报告用磷酸鈣柱分离口蹄疫病毒的感染性 RNA 获得成功，不过 Bernadi 及 Timasheff^[10]却报告了相反的結果。他們用超速离心分析証明經過磷酸鈣柱的艾氏腹水癌

細胞高分子 RNA 产生了明显的不可逆降解。本實驗室曾^[127]以脑心肌炎病毒 RNA 重复 Burness 及 Vizoso 的試驗, 过柱后 RNA 的活性部分消失, 初步試驗磷酸鈣柱不能将掺杂在 RNA 制剂中的多糖分离。

(4) Mandell 及 Hershey^[87]报告用甲基酯化牛血清清蛋白吸附在 Celite 上作成柱子, 可在室温中将不同的 DNA 分子及各 RNA 组分分开, 而且可把混杂的蛋白质也除去。Philipson^[92]利用这个方法将 38 S 的 DNA, 16 S 及 25~29 S 的 RNA 分离开来。

Cocito^[22]等則报告得不到这样的結果。Kubinski, Koch 及 Drees^[75,76]等則认为 Cocito 的結果可能与实验条件不同有关系。他們自己用这种柱子, 在 35°C 进行柱层离, 能将小儿麻痹病毒感染的細胞的 RNA, 分成 8 S, 16 S 及 23 S 三种组分, 既很稳定, 又是均一。且能将病毒的 RNA 和細胞的 RNA 分开, 小分子的 RNA 在大分子 RNA 的前面洗脱, 病毒 RNA 則在最后洗出, 而病毒 RNA 的活性并没有因经过柱层离而有所损失。

最近 Kubinski 及 Koch^[77]又报告了甲基酯化牛血清清蛋白柱虽然能对感染性 RNA 及 23 S RNA 保持稳定, 但对于介于 23 S 与感染性 RNA 之間洗出的, 相当于 27 S 左右的 RNA 组分(可能是相当于 m-RNA 的部分), 却不能保持稳定。总之目前尚未能找出一种十分满意的办法, 使 RNA 的分离提純达到完善的境地, 但是各式各样的方法也越来越多, 越来越好。这方面的前景是乐观的。

五、具有生物活性的高分子核糖 核酸的某些理化性质

由于感染性 RNA 仍未能与正常細胞的 RNA 完全分开, 而且是所能得到的感染性 RNA 的量非常微少, 不足以进行分析, 所以关于感染性 RNA 的理化性质的数据很难取得, 目前所有的多半是来自 TMV-RNA 或其他植物病毒的 RNA 制剂的理化性质。

一般高分子 RNA 的理化性质，在前面梁植权教授的文章中已有所论述，不再重复。兹将具有生物活性的 RNA 有特征的某些物理化学性质，简述如下：

(一) 分子大小 根据超速离心、粘度、光散射等数据计算的结果，一般认为具有活性的 RNA 大分子的分子量，是在 2×10^6 左右，任何的断裂或分子量的降低均使这些 RNA 失去活性。

以 TMV-RNA 为例，它是一个含有 6600 个核苷酸的 RNA 单股链，分子量在 2×10^6 左右。在这条多核苷酸链上只要产生一个断裂，就招致整个分子的失活。只有完整的 RNA 分子才有活性^[49,50,51]。一些动物病毒的 RNA 其分子量也认为是相当于 200 万这一级的，Colter^[20] 认为 Mengo 及西尼罗脑炎病毒、小儿麻痹病毒等的 RNA，其分子量约在 $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 左右。Wecker^[124] 计算出东方马脑炎病毒的 RNA 分子量约为 2×10^6 ，Strohmaier 及 Mussgay^[116,117] 用密度梯度法，测出口蹄疫病毒 RNA 的分子量约在 3.1×10^6 左右。

(二) 沉降行为 酚法 TMV-RNA 的水相提取液在超速离心图谱上是单分散相 (monodisperse) (参阅图 1, Cheng^[19]) 或近似单分散相的 (Cheo 等^[21] 及 Giever^[52], 参阅图 2)。动物病毒的 RNA，用杂有宿主细胞 RNA 的样品进行分析时，凡经过 1 M NaCl 处理的 RNA，其超速离心图谱均呈两个峰 (参阅图 3, 4)。S 值较大、移动较快的一个峰，其分子量在 2×10^6 左右，S 值较小、移动较慢的一个峰，其分子量在 6×10^5 左右。有活性的 RNA 似乎只随着分子量在 2×10^6 左右的一个峰移动，而与分子量在 6×10^5 左右的一个峰无关^[25]。

Cheo^[21] 在 25°C 研究 TMV-RNA 的不稳定性时，表明 RNA 起始在超速离心图谱上是近似单分散相的 11 S 的 1 个峰，随着 TMV-RNA 活性的逐渐消失，RNA 产生了降解，超速离心图谱迅速变为一系列分子较小的峰，活性愈消失，原来 11 S 的峰的面积就剩得愈小。

但是 Gavrilova, L. P. 及 Spirin, A. S.^[42] 研究在 37°C 保温



图1 TMV-RNA 的超速离心图^[19]。图中有“x”号处是玻璃上的刻痕,不是 RNA 组分。

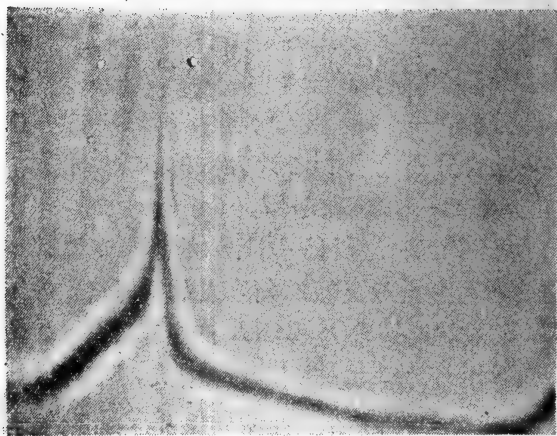


图2 TMV-RNA 的超速离心图^[52]

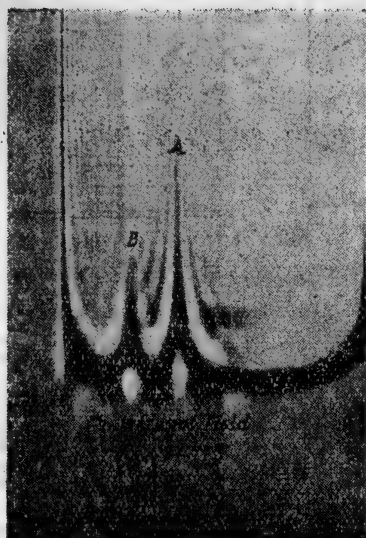


图3 从 Semliki 森林脑炎病毒感染的小鼠脑分离出来的 RNA 经 1 M NaCl 处理的高聚部分的超速离心图^[18]

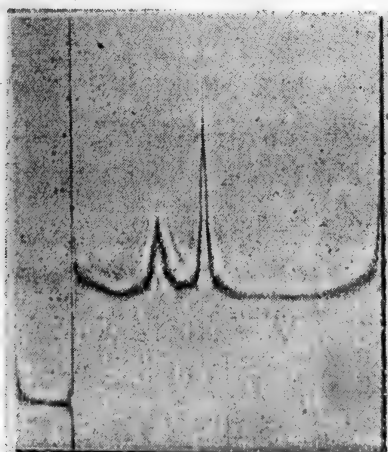


图4 从艾氏腹水癌细胞分离出来的经 1 M NaCl 沉淀后的 RNA 的超速离心图^[25]

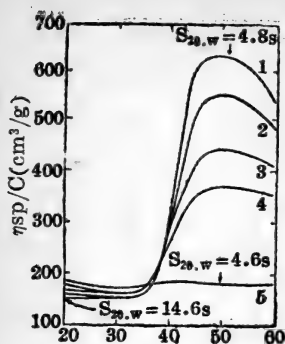


图5 感染性 RNA 的粘度热效应^[113]。曲线 1 为新鲜制备的感染性 RNA；曲线 2, 3, 4 为在室温保温后活性逐渐消失的 RNA；曲线 5 为放置到完全失活后的 RNA。图中表示出 RNA 活性最高时，粘度热效应最高，随着活性减退，粘度热效应也相应降低，到完全没有活性时则根本没有粘度的变化。

失活的 TMV-RNA 时，观察到它的紫外光吸收没有变化，粘度没有逐步下降，沉降常数也没有降低，从而得出这样的结论：在 TMV-RNA 感染性的自然消失过程中，RNA 大分子的大小及形状并无可以察出的变化，不可能有逐渐水解或降解发生。因此认为失去活性的原因，可能是由于某些氧化的变化引起的。

(三) 粘度 Spirin 等^[43,112,113,114]

报告高聚的有活性的 RNA 在 20~50°C 时其粘度无显著变化，但在 50~70°C 时则有显著升高，这种变化被称为粘度的热效应，无活性的 RNA 则无显著变化，所以认为粘度的热效应可以作为未降解的有活性的 RNA 的一种指标(图 5)。

Doty 等在粘度上的研究未能得到相似的结果，Spirin^[112] 认为可能是在他们的制备过程中，RNA 已先产生了降

解，故而未能产生粘度热效应。

上述大分子 RNA 的几个物理化学性质的变化明显地是和 RNA 分子的生物活性有关系，也就说明 RNA 的活性是和被它的结构所决定的。因此在研究 RNA 的活性的同时，研究其物理化学性质是很必要的。

六、核糖核酸的生物活性的检定及存在的问题

(一) 何谓生物活性 所谓“生物活性”一词还没有人明确地规定它的定义或标准。一般以下列方法之一或多种来表现。

1. 生物体接种 将动物病毒或肿瘤的 RNA 接种到适宜的动物体内，或将植物病毒 RNA 接种到适宜的植物体中，如能引起

相应的病变，则这些 RNA 都被称为具有生物活性，如 Gierer^[46,47]将 TMV-RNA 涂在烟草叶面上与 TMV 所引起的病变相同。Rushizky 及 Knight^[92]将蕃茄丛矮病毒 RNA 接种到烟叶上也产生了病变。Lacour^[74]等将人的淋巴肉瘤的 RNA 注入小鼠腹腔引起了同型的瘤。

2. 鸡胚接种 将要试验的 RNA 接种到鸡胚中，如有活性则会引起预期的病变或死亡，如 Wecker 等^[122]将东方马脑炎病毒 RNA 接种到鸡胚尿囊腔中，Ada 及 Anderson^[1]将 Murray Valley 脑炎病毒 RNA 接种到鸡胚绒毛膜中，与 Tufanov^[119]将鸡 Rous 肉瘤 RNA 进行鸡胚接种均得到产生病变或死亡的结果。

3. 组织培养 将要试验的 RNA 接种到 HeLa 细胞、人羊膜细胞、L-细胞或其他细胞单层的培养基中，使产生空斑和细胞病变，并以产生空斑的数目，作感染性的定量指标；如 Alexander^[4]等将脊髓灰质炎病毒 RNA 接种到 HeLa 细胞单层；Brown 等^[13]将口蹄疫病毒 RNA 接种到猪肾细胞培养基中；Sprunt 等^[115]将柯萨奇病毒 RNA 接种到 HeLa 细胞及人羊膜细胞单层组织培养基中；Colter 等^[24]将 Mengo 脑炎病毒 RNA 接种到 L-细胞组织培养基中，均得到良好的结果。

4. 其他方法 也有人企图在蛋白质生物合成的无细胞系统中加入 RNA，观察有无刺激蛋白质生物合成的作用。如 Kerr 等^[70]以脑心肌炎病毒 RNA 加入相应的蛋白质生物合成的无细胞系统中，发现合成率增加了 100%，在最适宜的条件下，甚至可以增加到 300%。若以其他来源的 RNA 加入同一系统中，则无此刺激作用。这一类的方法目前还不够成熟，不如前三类那样已被普遍应用。

(二) 检验核糖核酸活性的体外系统方法举例 植物病毒 RNA 的活性检验，一般要选用适当的整体植物来进行。动物病毒的 RNA，则可在体内或体外进行。体外系统已发展到可以定量的地步，对于感染机制、最适条件等的比较研究，有很大方便，因此采用的也愈来愈多。常见的有两种方法。一种是将 RNA 溶液

直接用吸管放入經洗滌过的易感染的細胞单层。經保温后,在单层細胞上盖上一层琼脂,几天后以活性染料染色,再計算空斑数目。第二种方法是 Colter^[27]改良成功的,他将已知数量的細胞(通常用 10^6 或 2×10^6 細胞)悬于 1 毫升 RNA 液中,放水浴中准确地保温一定的時間,然后用含有 10% 馬血清的 2X Eagle 的 Earle 氏液(用作組織培养生长介质),将上述悬液稀释到 10 毫升,然后再分成若干份,移入准备好的易感染的細胞单层中保温 1~1.5 小时,这样处理过的細胞,便下沉或粘附到細胞单层去,然后除去介质,再用琼脂盖上一层,經二三日后,以同样的方法,数形成的空斑。

Colter 的第二种方法比第一种方法好的地方,是細胞能均匀地与 RNA 接触,在細胞单层中,散在性分布的空斑易于計数,更适于定量試驗,对研究 RNA 与細胞相互作用的动力学,及最适条件等均較适用。

(三) 关于核糖核酸制剂的低活性的一些推想 文献中报告的 RNA 活性,一般只相当于等量 RNA 在原来病毒中未分离时所产生的活性的 0.1~1% 左右,为什么 RNA 只有这么低的活性呢? 这是大家所关心的問題,可能和几个方面有关:

1. 所試驗的 RNA 是否每个分子都是自然状态的呢? 根据大量超速离心分析的结果来看,一般高聚的 RNA 都呈两个峰,而有感染性的部分是随着沉降較快(即分子量較大的)的一个峰走的。从这一事实来看,可以判断 RNA 制剂中有相当大的部分是沒有感染性的。从 TMV 及其 RNA 的結構来看, RNA 在 TMV 中是紧密的单螺旋結構,但在溶液中則依温度和离子强度而成为松散无規綫团或舒张的鏈,或成为由整齐排列的螺旋区折叠成紧湊的棒状,或成为具有螺旋的紧湊綫团,它們相互之間可以互变(Spirin^[113])。这些結構显然和原来的結構有所不同,是在脱蛋白以后派生的結構(Spirin^[111])。虽然 Gierer 认为 RNA 的三級結構与活性无关,但是这些三級結構改变的試驗都已不是天然病毒中 RNA 的原始結構开始的而是已經改变的結構。而且将

RNA 与蛋白部分重組成病毒顆粒后,其活性甚至可恢复到80%。这种现象不能完全排除“RNA 需要維持部分特殊結構才能起作用”的可能,所以在制备中不能保持 RNA 的自然状态,很可能是 RNA 的低活性的原因。

2. RNase 的作用是否完全抑制了呢? 根据 Huppent 及 Pelmont^[67]的試驗,认为一般酚法 RNA 制剂中,可能还有 10^{-5} 微克 RNase/毫升 RNA 残留着未除去。宿主本身也有 RNase 能起作用,从皂土酚法的 RNA 制剂能提高活性,溶于 1 M NaCl (Alexander 等^[5]) 及 2 M $MgSO_4$ 中接种的 RNA (Holland 等^[65]), 均呈較高的活性 (RNase 在高盐浓度中受到抑制)。在提取过程中能完全抑制了 RNA, 就势必能获得更多有感染性的 RNA 分子。在宿主中能完全抑制 RNase 也必将使感染成功的机会大为增加。RNase 的完全抑制与否,恐怕是影响 RNA 活性的最重要的問題。

3. 此外还有宿主对 RNA 的敏感性問題。虽然 RNA 的宿主范围比原来的病毒还广一些,但也并非任何种类宿主都有相等的敏感性。TMV-RNA 接种到 Panto 菜豆叶上,其感染性就比烟叶大很多,因此,宿主的选择合适与否也影响 RNA 活性水平。

参 考 文 献

- [1] Ada, G. L. and Anderson, S. G., *Nature*, **183**: 799, 1959.
- [2] Ada, G. L. and Anderson, S. G., *Aust. J. Sci.*, **21**: 259, 1959.
- [3] Ada, G. L. and Anderson, S. G., *Virology*, **8**: 270, 1959.
- [4] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M., Sprunt, K. and Van Damme, O., *Virology*, **5**: 172, 1958.
- [5] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M., Sprunt, K. and Van Damme, O., *J. Exptl. Med.*, **108**: 493, 1958.
- [6] Bairden, F. C. and Pirie, N. W., *J. Gen. Microbiol.*, **17**: 460, 1956.
- [7] Bairden, F. C. and Pirie, N. W., *J. Gen. Microbiol.*, **17**: 80, 1957.
- [8] Belozersky, A. N., 核酸及其生物学意义讲座,第六讲,北京大学教材科出版, 1960.
- [9] Bellett, A. J. D., Burness, A. T. H. and Sanders, F. K., *Nature*, **195**: 874, 1962.

- [10] Bernardi, G. and Timasheff, S. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **6**: 58, 1961.
- [11] Blazsek, V. and Bukaresti, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 970, 1962.
- [12] Boedtke, H., Möller, W. and Klemperer, E., *Nature*, **194**: 444, 1962.
- [13] Brown, F., Sellers, R. F. and Stewart, D. L., *Nature*, **182**: 535, 1958.
- [14] Brown, F., Newman, J. F. E. and Stewart, D. L., *Nature*, **197**: 197, 1963.
- [15] Burness, A. T. H. and Vizoso, A. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **49**: 225, 1961.
- [16] Cartwright, T. E. and Lauffer, M. A., *Phytopathology*, **44**: 484, 1954.
- [17] Cartwright, T. E., Bitchie, A. E. and Lauffer, M. A., *Virology*, **2**: 689, 1956.
- [18] Cheng, P. Y., *Nature*, **181**: 1800, 1958.
- [19] Cheng, P. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**: 1557, 1959.
- [20] Cheng, P. Y., *Abstracts of Contributed Papers, Intern. Biophys. Congr.* July 31-Aug. 4, 1961, p. 219, E II:1, 73.
- [21] Cheo, P. C., Friesen, B. S. and Sinsheimer, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**: 305, 1959.
- [22] Cocito, C., Prinzie, A. and DeSomer, P., *Nature*, **191**: 574, 1961.
- [23] Cohen, S. S. and Stanley, W. M., *J. Biol. Chem.*, **144**: 589, 1944.
- [24] Colter, J. S., Bird, H. H. and Brown, R. A., *Nature*, **179**: 859, 1957.
- [25] Colter, J. S., Bird, H. H., Moyer, A. W. and Brown, R. A., *Virology*, **4**: 522, 1957.
- [26] Colter, J. S., *N. Y. Acad. Med. Symposium, Viral Infection of Infancy and childhood*, 10~21, Hoeber-Harper, Inc. New York, N. Y., 1960.
- [27] Colter, J. S., *Ann. Rev. Microbiol.*, **15**: 230, 1961.
- [28] Commoner, B. and Basler, E. Jr., *Virology*, **2**: 477, 1956.
- [29] Cox, R. A. and Arnstein, H. R. V., *Biochem. J.*, **83**: 4P, 1962.
- [30] De Carvalho, S., *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **3**: 104, 1960.
- [31] De Carvalho, S., *J. Lab. Clin. Med.*, **55**: 694, 1960.
- [32] De Carvalho, S., *J. Lab. Clin. Med.*, **55**: 706, 1960.
- [33] Diener, T. O. and Weaver, M. L., *Virology*, **8**: 531, 1959.
- [34] Fraenkel-Conrat, H., Williams, R. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **41**: 690, 1955.
- [35] Fraenkel-Conrat, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 882, 1956.
- [36] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Williams, R. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **25**: 87, 1957.

- [37] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Veldee, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **29**: 639, 1958.
- [38] Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B., *Virology*, **14**: 56, 1961.
- [39] Franklin, R. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **18**: 313, 1955.
- [40] Franklin, R. M. and Wecker, E., *Nature*, **184**: 343, 1959.
- [41] Franklin, R. M., Wecker, E., and Henry, C., *Virology*, **7**: 220, 1959.
- [42] Gavrilova, L. P. and Spirin, A. S., *Биохимия*, **24**: 503, 1959.
- [43] Gavrilova, L. P., Spirin, A. S. and Belozersky, A. N., *ДАН, СССР*, **126**: 1121, 1959.
- [44] Georgiev, G. P., *Биохимия*, **24**: 472, 1959.
- [45] Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C. I., *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **18**: 701, 1956.
- [46] Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C. I., *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **18**: 707, 1956.
- [47] Gierer, A. and Schramm, G., *Nature*, **177**: 702, 1956.
- [48] Gierer, A. and Schramm, G., *Z., Naturforsch.*, **11 B**: 138, 1956.
- [49] Gierer, A., *Nature*, **179**: 1297, 1957.
- [50] Gierer, A., *Z., Naturforsch.*, **13 B**: 477, 1958.
- [51] Gierer, A., *Z., Naturforsch.*, **13 B**: 485, 1958.
- [52] Gierer, A., *Z., Naturforsch.*, **13 B**: 788, 1958.
- [53] Gierer, A., Mundry, K. W., *Nature*, **182**: 1457, 1958.
- [54] Gierer A., *Biophys. J.*, **2** (pt. II): 5, 1962.
- [55] Ginosa, W. and Norman, A., *Nature*, **179**: 520, 1957.
- [56] Goldthwait, D. A. and Kerr, D. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 930, 1962.
- [57] Grinnan, E. L. and Mosher, W. A., *J. Biol. Chem.*, **191**: 719, 1951.
- [58] Harrison, B. D. and Nixon, H. L., *Gen. Microbiol.*, **21**: 591, 1959.
- [59] Hart, R. G. and Smith, J. D., *Nature*, **178**: 739, 1956.
- [60] Haschemeyer, R., Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**: 313, 1959.
- [61] Hays, E. F., *Nature*, **192**: 230, 1961.
- [62] Holden, M. and Pirie, N. W., *Biochem. J.*, **60**: 46, 1955.
- [63] Holland, J. J., McLaren, L. C. and Syverton, J. T., *J. Exptl. Med.*, **110**: 65, 1959.
- [64] Holland, J. J., McLaren, L. C. and Syverton, J. T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **100**: 843, 1959.
- [65] Holland, J. J., Hoyer, B. H., McLaren, L. C. and Syverton, J. T., *J. Exptl. Med.*, **112**: 821, 1960.
- [66] Huppert, J. and Sanders, F. K., *Nature*, **182**: 515, 1958.

- [67] Huppert, J. and Pelmont, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**: 214, 1962.
- [68] Kahan, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**: 408, 1953.
- [69] Kaper, J. M. and Steere, R. L., *Virology*, **7**: 127, 1959.
- [70] Kerr, I. M., Martin, E. M. and Work, T. S., *Biochem. J.*, **84**: 90 P, 1962.
- [71] Kickhöfen, B. and Bürger, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **65**: 190, 1962.
- [72] Kirby, K. S., *Biochem. J.*, **64**: 405, 1956.
- [73] Kirby, K. S., *Biochem. J.*, **66**: 495, 1957.
- [74] Knight, C. A., *Plant Pathology, Problems and Progress*, p. 470~476, 1959.
- [75] Kubinski, H., Koch, G. and Drees, O., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 322, 1962.
- [76] Kubinski, H. and Koch, G., *Virology*, **17**: 219, 1962.
- [77] Kubinski, H. and Koch, G., *J. Mol. Biol.*, **6**: 102, 1963.
- [78] Lacour, F., Lacour, J., Harel, J. and Huppert, J., *J. Natl. Cancer Inst.*, **24**: 301, 1960.
- [79] Laskov, R., Margoliash, E., Littauer, U. Z. and Eisenberg, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **33**: 247, 1959.
- [80] Lauffer, M. A., Trkula, D. and Buzzell, A., *Nature*, **177**: 890, 1956.
- [81] Lauffer, M. A., *Proc. IV. Intern. Congr. Biochem.*, Vienna, (1958), **7**: 167, 1959.
- [82] Lippincott, J. A. and Commoner, B., *Biochim. Biophys. Acta*, **19**: 198, 1956.
- [83] Lippincott, J. A., *Virology*, **13**: 348, 1961.
- [84] Littauer, U. Z. and Sela, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 609, 1962.
- [85] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [86] Maassab, H. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **45**: 877, 1959.
- [87] Mandell, J. D. and Harshey, A. D., *Anal. Biochem.*, **1**: 66, 1960.
- [88] Milman, L. S., *Биохимия*, **26**: 1082, 1961.
- [89] Möller, W. and Boedtke, H., *Fed. Proc.* **20** (No. 1, pt. 1): 357, 1961.
- [90] Nakamura, M., *Nature*, **191**: 624, 1961.
- [91] Nojima, T., *Report from Virus Lab., Kyoto Univ.*, **1**: 101, 1958. 轉引自 Nakamura, M., *Nature*, **191**: 624, 1961.
- [92] Philipson, L., *J. Gen. Physiol.*, **44**: 899, 1961.
- [93] Ramachandran, L. K. and Fraenkel-Conrat, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**: 224, 1958.
- [94] Reichmann, M. E. and Stace-Smith, R., *Virology*, **9**: 710, 1959.
- [95] Roth, J. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 903, 1962.
- [96] Rushizky, G. W. and Knight, C. A., *Virology*, **8**: 448, 1959.

- [97] Schramm, G., Z. Naturforsch., 2 B: 250, 1947.
- [98] Schramm, G. und Zillig, W., Z. Naturforsch., 10 B: 493, 1955.
- [99] Schramm, G. und Engler, R., Nature, 181: 916, 1958.
- [100] Schuster, H., Schramm, G. und Zillig, W., Z. Naturforsch., 11 B: 339, 1956.
- [101] Schuster, H. und Schramm, G., Z. Naturforsch., 13 B: 697, 1958.
- [102] Schuster, H., in Nucleic Acids vol. III, p. 245~301, 1960, Edited by E. Chargaff and J. N. Davidson, Acad. Press.
- [103] Sela, M., J. Biol. Chem., 237: 418, 1962.
- [104] Shortman, K., Biochim. Biophys. Acta, 51: 37, 1961.
- [105] Shortman, K., Biochim. Biophys. Acta, 55: 88, 1962.
- [106] Sibatani, A., Yamana, K., Kimura, K. and Okagaki, H., Biochim. Biophys. Acta, 33: 590, 1959.
- [107] Siegel, A., Ginosa, W. and Wildman, S. G., Virology, 3: 554, 1957.
- [108] Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H., Virology, 14: 59, 1961.
- [109] Sokol, F., Libikova, H. and Zemla, J., Nature, 184 (suppl. 20): 1581, 1959.
- [110] Spirin, A. S., Gavrilova, L. P. and Belozersky, A. N., ДАН, СССР, 125: 658, 1959.
- [111] Spirin, A. S., Биохимия, 24: 938, 1959.
- [112] Spirin, A. S., Gavrilova, L. P. and Belozersky, A. N., ДАН, СССР, 134: 717, 1960.
- [113] Spirin, A. S., J. Mol. Biol., 2: 436, 1960.
- [114] Spirin, A. S., Биохимия, 26: 511, 1961.
- [115] Sprunt, K., Redman, W. H. and Alexander, H. E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 101: 604, 1959.
- [116] Strohmeier, K. and Mussgay, M., Science, 130: 217, 1959.
- [117] Strohmeier, K. and Mussgay, M., Z. Naturforsch., 14 B: 171, 1959.
- [118] Takahashi, W. N., Karler, A. and Knight, C. G., Virology, 6: 637, 1958.
- [119] Tufanov, A. V., Вон. Онкол., 7: 46, 1961.
- [120] Volkin, E. and Carter, C. E., J. Am. Chem. Soc., 72: 1516, 1951.
- [121] Wacker, W. E. C. and Vallee, B. L., J. Biol. Chem., 234: 3257, 1959.
- [122] Wecker, E. and Schäfer, W., Z. Naturforsch., 12 B: 415, 1957.
- [123] Wecker, E., Virology, 7: 241, 1959.
- [124] Wecker, E., Z. Naturforsch., 14 B: 370, 1959.
- [125] Welkie, G. W., Phytopathology, 49: 114, 1959.
- [126] Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, F., Z. Naturforsch., 7 B: 148, 1952.
- [127] 刘培楠, 刘士廉, 林沁英, 肖梓仁, 未发表的工作, 1962.

第八讲 烟草花叶病毒核酸与 蛋白研究的进展

李 祿 先

中国科学院微生物研究所

一、引 言

最近年来,在生物学各学科的飞速进展中,病毒的研究占着很重要的地位。我們知道,当前生物学研究的主流之一,是要通过化学和物理的方法来解决具有生物活性的大分子(如蛋白和核酸)的問題,而病毒是最合适的研究模型之一。因为病毒可视为生物的最小单位,它主要是由核酸和蛋白組成,却具有生命的多种基本性质。

在病毒研究中,烟草花叶病毒(简称 TMV)的研究資料最多,1892年 Iwanowsky 发现烟草花叶病的病原物质能通过素烧坩鍋^[40],是人类第一次发现病毒病,从而在微生物学中开辟了“病毒学”这一新領域。1935年 Stanley 得到了 TMV 的晶体^[80],这工作又在生物学观点中創造了新的境界,因为他証明了一个蛋白分子可以具有只有整个細胞中才有的各种生物特性。他的工作对于生长繁殖、遗传、免疫及其他方面的研究都有深刻的影响。举一个实例來說,小儿麻痹症病毒疫苗的成功,实导源于 Stanley 的关于 TMV 鈍化問題的研究。二十一年以后, Gierer 和 Schramm^[24]以及 Fraenkel-Conrat 等^[16]証明了 TMV 的核糖核酸(RNA)(而不是蛋白)才是病毒活性的关键物质,它和整体病毒一样能感染、繁殖和遗传;他的子代并不是單純的 RNA,而是和母代一样的整体病毒。这工作标志着生物学上另一重大的进展,肯定了核

酸作为遗传物质基础的地位,说明了核酸与蛋白的关系。

在另一方面,用病毒作为核酸研究的材料,有特别便利的地方。因为从正常的细胞内提取的核酸或核蛋白,往往是功能不同的许多物质的混合物,不易加以区别;而病毒核蛋白却比较纯净,它的生物活性也易于测定。从 TMV 核酸结构与其蛋白合成的关系来研究遗传信息传递较为方便,因此,进行 TMV 研究的科学家在阐明以人工方法改变核酸的初级结构而产生病毒变种,和核酸结构与蛋白合成的关系等方面,最近又作出了极重要的贡献。

二、烟草花叶病毒的結構

(一) 病毒分子的結構 TMV 能以普通的硫酸胺沉淀法提纯结晶,它在硫酸胺溶液中呈针状结晶^[80],分子量 39×10^6 ^[2],含 RNA 5.1%^[42],其余部分为蛋白质。病毒分子呈杆状,长约 3000 Å,紧裹时直径 150 Å (涨大时直径约为 180 Å)。分子中间嵌着一个螺旋状的 RNA 分子,沿着 RNA 螺旋方面四周,排列了约 2130 个蛋白质分子小单位(我们称这种分子小单位为亚基);螺旋节长(沟距) 23 Å,每三转相当于 49 个蛋白分子^[21]。用 X 线分析技术中的同晶型置换法,可以算出病毒分子中间有一个孔隙,直径约 35~40 Å^[6,20](图 1),孔隙内面如用磷钨酸或醋酸铀染色,在电子显微镜下就可清晰地显示出来^[39,4],用同法又可以看到分子表面的沟纹^[54],甚至每一个蛋白亚基^[35]。用铅和甲基汞所做的同晶型置换法研究^[6,20],加上 TMV 分子与重构的不含核酸的病毒蛋白(A 蛋白)的比较研究,都证明病毒分子中 RNA 的直径是 80 Å,这表示 RNA 的确是嵌在蛋白中间的。这病毒

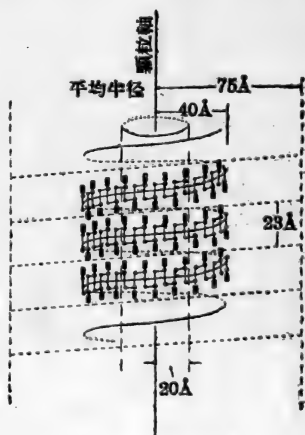


图 1 烟草花叶病毒 RNA 单螺旋链图^[29]

RNA 分子是一条螺旋形的单链，每一转包含 50 个核碱，核碱的方向与中轴平行，RNA 的半径为 40\AA ，节长 23\AA (图 2)，约每三个核苷酸和一个蛋白亚基相结合，图中许多黑粒相連成念珠状的链代表 RNA 分子，每粒念珠代表一个单核苷酸，外面环绕的番木瓜似的東西，代表蛋白分子，这样算来，RNA 链的长度应为 $33,000\text{\AA}$ 。这一点已由 Hart 的电子显微镜研究证明^[31]。

用 X 綫晶譜分析的結果，也可用其他方法証明。Schramm 等用 0.5 M pH 10 的碳酸鈉緩冲液处理 2% 的 TMV 溶液，使蛋白质从病毒分子逐漸脫离。这样，中間的核酸链就显示出来，在电子显微镜里可以明白看到^[68]。如果用阴离子去污剂(十二烷硫酸鈉)加热处理，也得相似的結果^[32,33]。在这种情况下，病毒蛋白从两端脫下，纖維状物质从病毒分子两端伸出，长度大多在 3000\AA 左右，如用核糖核酸酶(RNase)处理，裸露的纖維就消失不见，由此証明裸露的纖維就是 RNA。

烟草花叶病毒的蛋白和核酸，可以用有机溶剂(如酚、氯仿、戊醇等)、去污剂(如十二烷硫酸鈉)或在盐类中加热的方法将它们分开，而仍保持核酸分子的完整和生物活性。

(二) 核酸的结构和性质

1. 核酸的成分和分子量

TMV-RNA 的分子量約 2.1×10^6 ，链长约 $33,000\text{\AA}$ ，关于分子量的問題，过去分歧很大，现在也沒有完全一致。近年来用冷酚法制备核酸简单易行，可在低温和中性 pH 的条件下，将蛋白除净；蛋白和酚直接接触，可使許多酶(特别是 RNase)变性，这样就較能保持核酸的完整和生物活性。然而按这方法制成的核糖核酸，仍是不均一的，在超速离心分析中，主要可分为两部分，第一

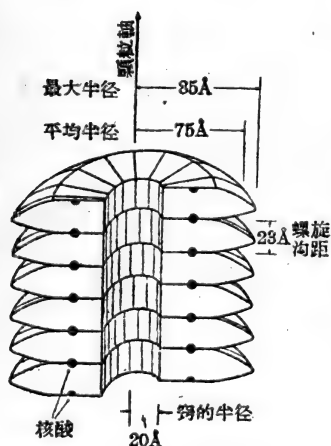


图 2 烟草花叶病毒颗粒片段结构剖面图^[21]

部分比較均一，分子量在 1.7×10^6 左右(校正后为 2.1×10^6)，和光散射的結果相符，据 Gierer 說只有这部分具有生物活性^[25,26]，第二部分是不均一的，分子量較小，也有生物活性，是否降解产物，尙难断定。其他为 Hopkins 和 Sinsheimer^[38]，Ginoza 和 Norman^[48]，Loring, Fujimoto 和 Eng.^[49]，Cheo, Frieser 和 Sinsheimer^[7]，Boedtker^[2]，Doty 等^[11]，Spirin 等^[22,23,75,76,78]，从光散射、X 光敏感量、超速离心、粘度、旋光散射……等观察所得的結果，都倾向于支持 Gierer 的看法。Commoner 还指出，TMV-RNA 的长鏈一端，只要損失2%的单核苷酸，就能失去全部活性^[9,55]。所以目前研究烟草花叶病毒大部分学者，都认为一个具有生物活性的核酸分子量應該在二百万左右。这和一个病毒分子只能有一个核酸分子的說法是相符的。

和 Gierer 等持有不同看法的，以 Fraenkel-Conrat 和 Singer^[17]这一派学者为代表。他們认为，上述大分子的核酸，只不过是一些分子量为 0.25×10^6 的核酸亚基的聚合体。分子量較小的核酸，同样可以具有活性。

二派学者过去几年来，展开了尖銳的論爭，他們提供的实验論据，将在下面予以介紹。

我們现在将烟草花叶病毒核酸分子量按照 2.1×10^6 計算，这样大的分子至少包含平均分子量为 320 的单核苷酸 6000 个；如以上所說作为一个单鏈，鏈长约 33,000 Å，拉直时应达 50,000 Å，这和 X 綫衍射及电子显微鏡的观察是一致的。据 Knight 的分析，TMV-RNA 中四种单核酸的比例为腺嘌呤 29.8%，鳥嘌呤 25.3%，胞嘧啶 18.5%，尿嘧啶 26.3%^[41]。

2. 核酸的一級結構 烟草花叶病毒的初級結構，主要是指四种单核苷酸排列的順序，这是当前生物化学中、也是生物科学中最艰难的問題。近几年中，已經有人开始用酶解和化学的方法来嘗試這個問題，目前這個問題的研究在方法上还有困难。第一，在着手測定核苷酸序例以前，首先得制备一种原狀的均一純淨的核酸，用现有认为最理想的方法进行制备的核酸，仍是不均一的。最

近 Fraenkel-Conrat 和 Singer^[10]在冷酚制备时加入皂土吸附 RNase 以防止降解,但是,是否能获得均一的核酸未见报导。第二,烟草花叶病毒核酸的分子量太大,想通过化学和酶解的方法来测定核苷酸顺序目前还没有完善的方法。目前用酶降解核酸只能获得仅包含一、二、三个单核苷酸的小片段寡核苷酸,要从这样小的片段估计一个有几千个核苷酸的长链是很困难的。

虽然要解决核酸中核苷酸的排列顺序还存在着技术上的困难,有些生化学者如 Reddi^[59,60,61,63,65,66], Hart^[34], Knight^[63,67], Rushinzyk^[67], 田中和宇佐美^[83]等都对 TMV-RNA 的酶解进行了研究,也获得一些初步的结果。

用核酸水解酶,通常能获得单、双和三核苷酸。然而用牛胰 RNase 并不能将 TMV-RNA 完全分解,有个不被降解的部分,曾被称为 TMV-RNA 的“核心”,如用适当的方法使 TMV-RNA 完全降解,此水解液的紫外光的吸收可较原来大分子增加 37% 之多(称为低色效应)。如将 TMV-RNA 先用牛胰 RNase 降解,紫外綫吸收可增 15%,再将余下的“核心”用碱或植物叶的 RNase 降解,紫外綫吸收可再增 21%。换句话说,“核心”部分所引起的“低色效应”占总“低色效应”的 60%^[62],而这“核心”的长,只有 6 个单核苷酸,Reddi 认为这主要是由于“核心”含嘌呤较多的缘故。

TMV-RNA 經牛胰 RNase 降解所得各种单核苷酸和各种寡核苷酸,相互间的比例与酵母 RNA 的降解物固有很大区别,即使不同株系的 TMA 之间,也有明显的差别。

3. 核酸的钝化 在整体的病毒分子中, RNA 是明显地不含氢键的,至于它和病毒、蛋白如何连接在一起,目前还不了解。Doty 在 1959 年就指出在脱去蛋白以后,具有感染性的病毒 RNA 则有氢键的存在^[11],他用旋光散射的方法测定 RNA 分子中有一半核苷酸是呈螺旋状排列的。Spirin 和 Belozersky 等^[77],对于二级结构的问题又作了一系列的考察,包括旋光性、粘度、沉降及光散射等性质在不同温度下的差异,他们认为分子量为二百万的 RNA,在室温下是一个很有组织而且很结实的杆状螺旋,长度和

直径的比是 60:80, 具有二級結構(氢鍵及螺旋狀)和三級結構(整分子繞成螺旋), 加入尿素仅破坏氢鍵而使螺旋結構疏松, 只有加热, 才使三級結構破坏, 这主要是由于磷酸基間的靜电排斥力。

Haschmeyer, Singer 及 Fraenkel-Conrat 等从 258 毫微米吸光、旋光及沉降等方法观察^[36], 认为在金属离子 Me^{++} 或 Me^+ 的影响下 TMV-RNA 能从比較杂乱无章的状态, 改变为較有秩序与組織的构型, 两者之間可以互相轉換, 而均具有感染性。

Loring 等^[47, 48] 曾研究 TMV-RNA 中的金属含量, 发现其中含 Mg^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} 等离子, Fe^{++} 的含量比較恒定, 可能是使核酸結構稳定的金属。据 Wacker 等在第五屆国际生物化学會議中报告^[85], TMV-RNA 还含有 Sr^{+++} (6 ppm)、 Ra^{++} (23 ppm)、 Al^{+++} (77 ppm)、 Cr^{++} (ppm)、 Mn^{++} (6 ppm) 及 Ni^{++} (16 ppm)。他們研究 RNA 加热后在 258 毫微米的吸收光的变化, 认为核酸的一部分二級結構与三級結構是依靠金属离子維持的。

1961 年 Boedtker^[3] 用光散射、沉降、粘度、旋光射散、光吸收等方法, 研究在常温下 0.1M 磷酸緩冲液中 TMV-RNA 的結構, 认为 RNA 所具有的部分螺旋結構相当于杂乱无章的多核苷酸鏈, 如果将此 RNA 在 80°C 加热一下又立即冷却或任它在 25°C 靜置两天倒反而成更紧密而稳定的結構型, 金属离子能稳定螺旋結構, 在这方面, Mg^{++} 的效力相当于 Na^+ 的 25,000 倍。

我們可以看到 Doty 和 Boedtker 对于 TMV-RNA 二、三級結構的基本概念很有不同, 但他們和 Spirin 一样, 試驗結果也是完全支持 Gierer 的, 认为有活性的 TMV-RNA 是一个連續的, 分子量在 2×10^6 左右的大分子。

許多物理的(如光、声、热)和化学的因子, 都能引起 TMV-RNA 的初級和二、三級結構的改变, 而使其失活, 如不失活, 就会产生新的品种, 这是人工引起突变的基础。

用热的处理鈍化 TMV-RNA 的問題 Ginosa^[39] 用去污剂制备 TMV-RNA, 在中性 pH 和 37 ~ 65°C 的范围内, 热对鈍化

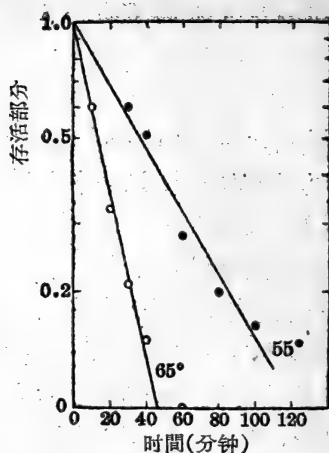
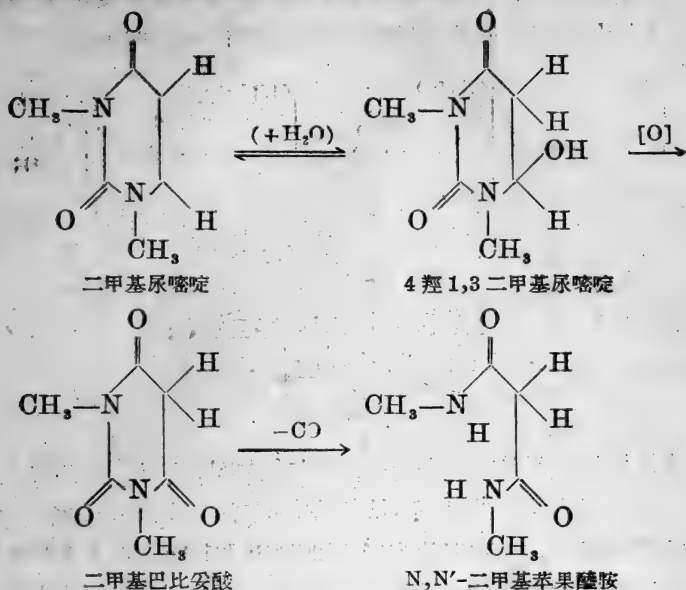


图3 烟草花叶病毒 RNA 在 pH 7.15, 0.1 M 磷酸缓冲液中加热的存活图^[29]。

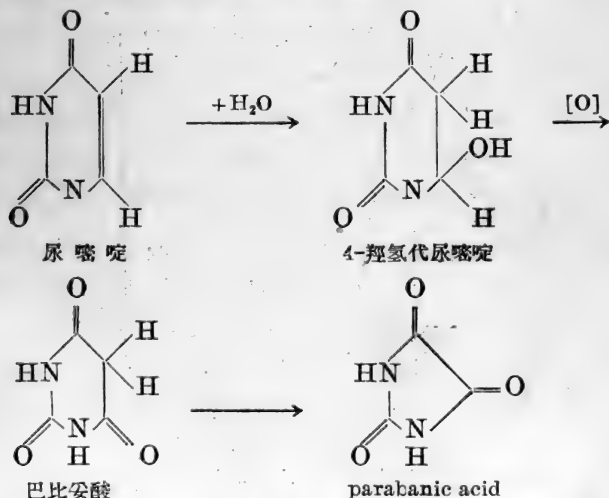
是呈一级效应的(图3),整体病毒也是如此,从不同温度的钝化速度常数可以估计使感染性消失的活化热量(ΔH)是 19 kcal/mole。这数值比 DNA 遗传活性消失所需的热量(93 kcal/mole)低得多,可能是由于 TMV-RNA 只要有一个磷酸酯键断裂就可失活,而 DNA 却须有 15 对连续的氢键破裂才造成二级结构不可逆的破坏。由于 TMV-RNA 的活性熵是个负数(-19.5 entropy units), Ginoza 猜想活化时有环状的磷酸三酯形成,这才使核酸分子降解而断裂,一分子中只有一个磷酸酯键断裂,就会使整个分子失活。

TMV-RNA 对 X 射线照射是敏感的,钝化呈一级效应,在干燥状态或冰冻状态使 66% 钝化剂量是 3.0×10^5 r, 和整体病毒分子的钝化剂量相同,这表示 X 射线钝化完全由于核酸的改变,相当于 3.0×10^5 r 剂量的“辐射敏感分子量”(radiosensitive molecular weight)恰好是 $2.1 \sim 4.0 \times 10^6$, X 射线引起的一次断裂即足以钝化整个分子^[28],这与 Gierer^[25] 关于有活性核酸分子量的学说也是相符的, X 射线钝化并不引起分子量的下降,反映在 260 mμ 光吸收方面,消光数的下降仅 1%。这表明 X 射线钝化主要是引起尿嘧啶核苷酸或胞嘧啶核苷酸的断裂。S. Y. Wang 曾证明二甲基尿

嘧啶光解的机制如下式^[86]:

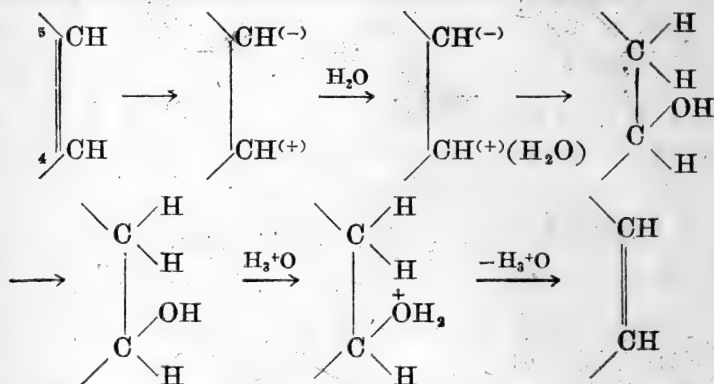


由于他証明二甲基巴比妥酸是 4-羥 1,3 二甲基尿嘧啶的光作用产物,就可以推測尿嘧啶光解的机制是:



很多的文献报告在 253.7 毫微米照射下,很多胞核苷酸的衍

生物,特别是核苷酸,能产生光化产物,这种产物在黑暗中加热或酸化,就会大部恢复原状,其间的机制經同位来証明如下^[73]:



被紫外光照射的不同株系的 TMV 之間,敏感性差异很大。据 Siegel 等的报告,普通品系 U1 与另一变种 U2 之間敏感性在干燥状态基本相等,在湿润状态时 U2 却比 U1 敏感 5.5 倍^[73] (图 4),但从两株中所提出的 RNA,其紫外光敏感性則相等^[74]。紫外綫对 RNA 的鈍化机制目前还不了解,似是 RNA 分子局部起

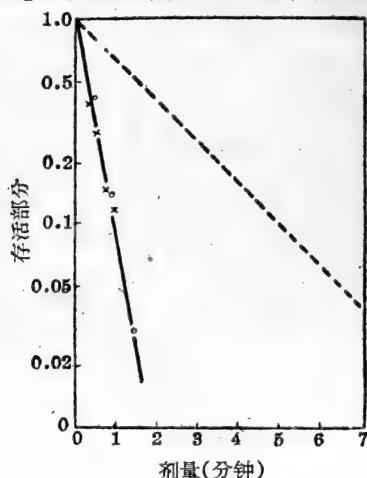


图 4 烟草花叶病毒 U1 与 U2 种株及其感染性核酸的紫外光敏感性^[73]

x = U1 核酸; o = U2 核酸; ---- U1 病毒; —— U2 病毒。

改变^[61]。

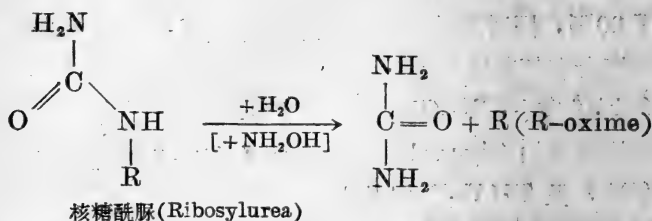
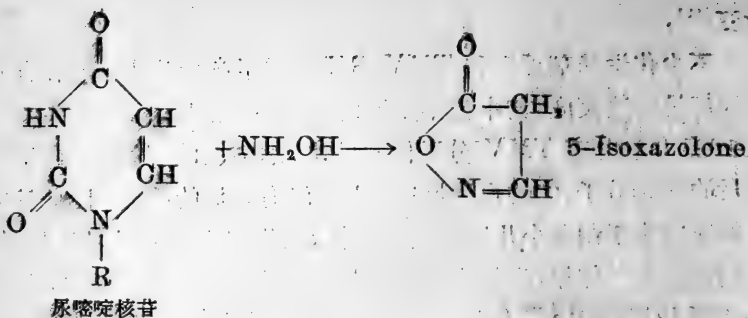
不少化学药剂可以和 TMV-RNA 作用产生钝化。钝化作用一般都呈一般反应,其中较早知道的一个,要推甲醛,Stanley^[61]在 1936 年就处理 TMV 分子使其钝化,这方法的好处是,經它处理后的病毒分子,它的血清反应性质,沒有明显的改变,因此这方法就被应用于制备小儿麻痹病毒疫苗,获得很大的成功,甲醛不但和病毒蛋白起作用,当然亦和 RNA 起反应,才能产生钝化,如用 1~2% 的甲醛在 pH 6.8 予以处理 TMV-RNA, 紫外綫吸收可增大了 30%, 同时吸收峰轉变到較原来高 3~5 毫微米的波长,这对一切含有氨基的核糖核酸衍生物都有同样的效应,这主要是由于 Schiff 基($-N=CH_2$)的形成^[12]。

其他醛类如 Glyoxal 与 Kethoxal (B-乙氧-2 酮丁醛)都能钝化 TMV 及 TMV-RNA^[79]。

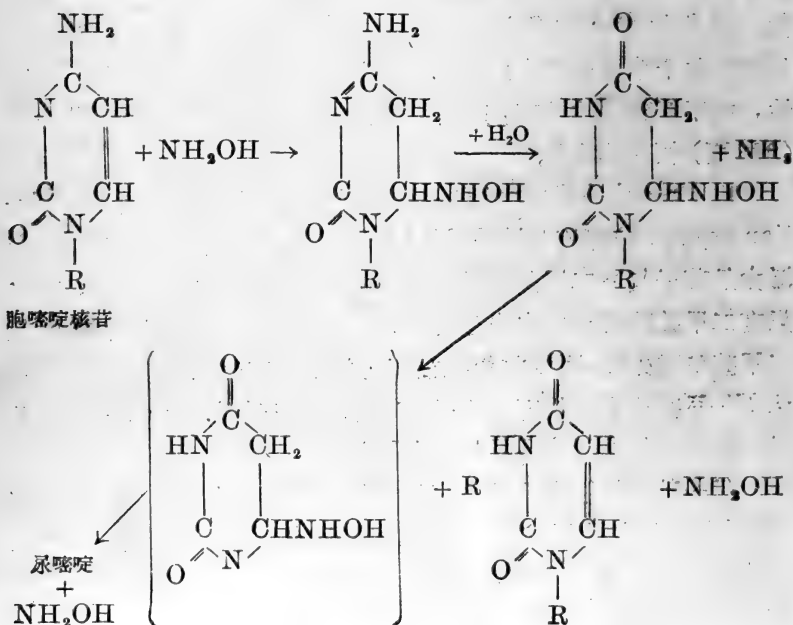
TMV-RNA 和亚硝酸作用产生一定的产物,从其钝化率的測定,可以計算每分子的核酸,至少需要几个氨基才能保持感染性。据 Schuster 和 Schramm 的推算^[70], 6000 个单核苷酸中只要有二个单核苷酸中的核碱被脫氨,就能使整个分子失去感染性,由于亚硝酸的处理,产生了变种,在“核酸结构的改变”一段(225 頁)中还要詳述。

据 Fraenkel-Conrat 最近的报导^[18], 許多烷化剂 (alkylation reagents) 都使 TMV-RNA 迅速失活,它們对 RNA 的作用活力是芥子气 > 二甲基硫酸 > 乙烯和丙烯氧化物 > 碘乙酸,其中只有二甲基硫酸能使之产生变种。TMV-RNA 在中性溶液中經二甲基硫酸处理,可使其氨基或环上的氮甲基化,如腺嘌呤核苷变为 N⁶-甲基腺嘌呤核苷与 1-甲基腺嘌呤核苷^[56]。此外,溴和过碘酸鈉也都能使 TMV-RNA 钝化^[50]。

另一种值得注意的钝化剂是羟氨、它也能在中性溶液中与 TMV-RNA 起作用,这钝化剂的特点是它只和核酸起作用,而与病毒蛋白无作用。据 Schuster^[71] 最近的报道它和脲嘧啶核苷的作用机制是:



在 pH 6.2 及 20°C 作用都可将胞嘧啶变为尿嘧啶。



所以在 TMV-RNA 里，我們可以把尿嘧啶完全除去而不使核酸长鏈断裂，另一方面又可将胞嘧啶改为尿嘧啶，当 RNA 在 pH 6.15 和脲氨作用时，胞嘧啶的反应比尿嘧啶約大 30 倍，而在 pH 9.15 时，尿嘧啶却較胞嘧啶快 8 倍，很明显，通过脲氨的处理，一定可以获得許多新变种。

此外还有一些非自然的核碱如偶氮鳥嘌呤、5 氟尿嘧啶、2 硫氢基尿嘧啶等进入 TMV-RNA 中，也可引起 RNA 鈍化^[50]。

(三) 蛋白质的結構 每个烟草花叶病毒分子含 2130 个蛋白亚基，这些亚基蛋白可以用 pH 10~10.5 碱性緩冲液硫酸胺溶液，或电泳等法使从核酸分离而不变性。据 Fraenkel-Conrat 說，冷的 67% 的乙酸是最理想的分离剂^[14]。最近几年来，已知使用酚来分离的蛋白亚基，經用强碱或 8M 脲溶液处理也能恢复它的二級結構，从 Ramachandran^[56] 的氨基酸分析結果推算，每个亚基应含氨基酸 164 个，分子量至少应为 18,270。

以后 Gish, Ramachandran 和 Stanley^[30] 及 Ramachandran 和 Narita^[57] 尤其是 Narita^[52] 出色解决了比較困难的 N-末端的測定，发现 TMV 蛋白亚基的 N-末端是与酪氨酸相邻的 N-乙酰基絲氨酸（后来他又发现一个和 TMV 生物特性很接近的王瓜病毒的蛋白的 N 末端是 N-乙酰基丙氨酸-酪氨酸）。亚基的 C-末端是苏氨酸，是我国生物化学家鈕經义先生在跟 Fraenkel-Conrat 工作时共同測定的^[58]。

蛋白亚基的全部氨基酸序列，到了 1960 年就由 Schramm 的实验室^[1] 和 Fraenkel-Conrat 的实验室^[84] 分別独立完成。据 Schramm 等的分析，每个蛋白亚基含氨基酸 157 个，而 Fraenkel-Conrat 則得到 158 个，第 92 个氨基酸(精氨酸)后面只跟随一个异白氨酸，而 Fraenkel-Conrat 則声称是跟随了两个异白氨酸分子，其他氨基酸的次序亦有不一致的地方，还待最后确定。

由此可知，从 N-末端数起，第 26 个氨基酸是半胱氨酸，它和甲基汞連結后显示出和病毒分子軸心的距离是 56 \AA ^[9]，运用这样的技术很有利于推测蛋白亚基的空間构型。

蛋白质亚基是如何与核酸连接在一起，目前还不很了解。据 Fraenkel-Conrat 的意见，因为与核酸脱离的蛋白在适当的 pH 和离子强度下能在核酸周围重新聚合成完整的病毒^[13,15]，所以含价键是不会有，未解离的羟基可能以氢键的形式参加作用，此外还有以共价键和离子形态連結的可能，他的看法得到其他学者如 Koshland, Simmons, Watson^[44] 等的支持。Reddi 指出^[64]用紫外綫分光光度計測定 TMV-RNA 加 TMV 蛋白的吸收光譜和完整 TMV 的是一样的，假使，嘌呤嘧啶和蛋白形成复合体而减少吸收光，結果就不会这样。Koshland 等用有 O^{18} 标志的 H_2O^{18} 代替 H_2O ，并以去污剂脫蛋白，也証明蛋白和 RNA 的磷酸之間沒有三酯鍵 (triester linkage)，因为如果有的話， O^{18} 應該在 RNA 的磷酸中发现。Fraenkel-Conrat 又认为每个亚基含有的一个內藏的(半胱氨酸)硫氢基，对稳定二級結構可能很有用处。

三、病毒核酸的生物活性

(一) 核糖核酸感染性的发现和肯定 1952 年 Westphal^[57] 等用温热的酚水混合液处理細菌蛋白能成功的将蛋白帶入酚相，核酸留在水中，这方法后来經 Schuster, Schramm 和 Zillig^[69] 改良，最后在 1956 年为 Gierer 和 Schramm^[24] 所采用，并且成功地提出具有生物活性而基本上不含蛋白质的 TMV-RNA，次年 Fraenkel-Conrat 等^[16] 也宣布他用去污剂 (十二烷硫酸鈉) 制备得同样的核酸。

上述学者們的工作，說明除去蛋白外壳以后的 TMV-RNA，仍有感染力和繁殖力，烟草在感染 TMV-RNA 以后发生的疾病和感染了病毒的无异，而且能生成完整的病毒。至于除去了 RNA 的病毒蛋白，不論在亚基的水平或重聚为大分子的水平上，都沒有显示任何感染性。

由于酚处理法和去污剂处理法制备的 RNA 与完整的病毒分子比較，RNA 制剂只保存原来病毒的 0.3% 左右的生物活性，引

起了反对者提出了一系列的质問：

第一，这样低的活性难道不可能是由于試驗誤差，例如由于少量的未除淨蛋白的整体病毒的污染所致？

第二，即使 RNA 制备中沒有含有整体病毒分子，这样低的感染率，是不是正足以說明蛋白对感染性相等重要性？

第三，除非能証明核酸中絲毫不含蛋白质，否則这一些剩余的生物活性是否正好由于这点剩余的蛋白质的影响？

第四，即使 TMV-RNA 中不含任何蛋白，怎能排除宿主体內的蛋白不对它起主导作用？

但是六年来經 Schramm 的實驗室，和 Fraenkel-Conrat 的實驗室中的科学家們的努力，对这些問題已大部分給予有力的答复：

首先他們用一系列的實驗証明以上两种方法制备的 RNA 的感染是由于 RNA 本身，而不是由于可能夹杂的整体病毒。第一，用 RNase 处理 TMV-RNA 制备品，就能引起了感染性完全丧失。但 RNase 对 TMV 病毒分子是不起作用的。这就証明引起感染性是由于有 TMV-RNA 的存在。第二，用抗病毒血清处理，可以很快地使整体病毒失活，而不影响 RNA 的感染性。第三，TMV-RNA 在加热时迅速失活而病毒分子則稳定的。第四，TMV 的沉降常数和 TMV-RNA 的沉降系数是明显地不同。第五，TMV-RNA 的制品在电子显微鏡下也找不到整体病毒。

从这些實驗証据已可完全排除病毒分子的污染問題，因此肯定了 TMV-RNA 本身是具有感染、繁殖的性质的。

(二) 病毒分子的重組 1955 年在 TMV-RNA 的感染性被証明以前，Fraenkel-Conrat 和 Williams^[16]，以后有 Commaner 和 Lippincott 等^[8,45]曾先后发表用 pH 10.5 緩冲液从 TMV 脱离下来的病毒蛋白与用十二烷硫酸鈉制备的 RNA 相混合，又可以組成具有感染性的病毒，而当两者分开时，对心形烟叶都沒有感染性，这是由于当时还不能制备出具有活性的 TMV-RNA，在具有感染性的 TMV-RNA 被发现后，Fraenkel-Conrat 和

Singer^[13,15] 又按照以前重組病毒的方法做了一些非常出色的工作。

他們用感染較高的(0.5%)核酸,和病毒蛋白在最适宜的情況下(在室溫下用0.1%蛋白溶液在0.1 M 焦磷酸緩沖液中加上相當于蛋白量1/15~1/20,最好是1/100~1/200的核酸量)使之結合重新組成病毒。此病毒的外形及核酸含量和原病毒完全相同,而感染性可以恢復30%~80%。這工作經過許多其他實驗室的重複證明。TMV 和別的病毒一樣,也有許多不同的株,它們的蛋白質亞單位的分子量都在18,000左右,但組成很不相同,血清反應也不同。例如車前草株 TMV (HR-TMV) 和普通株 TMV 就是如此。Fraenkel-Conrat 就利用這種特點進行不同株的核酸與蛋白質的混合重組。在 HR-RNA 和 TMV 蛋白重組後,將之感染煙葉,發生類似 HR 的斑點,在 *Nicotiana tabacum* 和 *N. sylvestris* 兩種煙草上的單斑試驗,顯示和兩個母株都很不相同,但是這個類似 HR 的病毒卻受到抗 TMV 血清的抑制而不受抗 HR 血清的抑制,當 TMV-RNA 和 HR 蛋白重組後煙葉上斑點的性質及抗血清試驗都和上述相反。

混合重組的病毒的后代蛋白質的性質與所用核酸的原來病毒幾乎完全相同,而重組後病毒后代的生物活性則和原來病毒的蛋白質無關。Fraenkel-Conrat 等的重組試驗,說明了(1) TMV 核酸感染很低的原因是由于失去蛋白質外殼的保護;(2)核酸在感染性和遺傳訊息的傳遞上,處於主導地位,蛋白和核酸重組的專一性是不強的,用人工合成的多核苷酸和病毒蛋白也能聚合成桿狀外形似 TMV 的質點,並且不受 RNase 的分解,但是沒有生物活性,如果不用 RNA 作軸心,只用病毒蛋白,在適當條件下也能聚合成桿狀,也是沒有活性。血清蛋白與 TMV-RNA 結合,不能形成桿狀,卻抑制了核酸的活性,所以桿狀聚合可能是穩定 TMV-RNA 的重要條件。

(三) 關於核酸活性的爭論

1. 核酸感染率很低的原因 上述 Fraenkel-Conrat 的重組

試驗可以說明失去了蛋白質外殼的保護是核酸生物活性降低的主要原因。此外對於 TMV-RNA 感染率過低這一事實，不同科學家還有各人自己的解釋和證據。

(1) 在前面我們已經提到過，Gierer 的工作用酚處理的方法製備的 RNA 是不均一的，只有分子量最高的部分具有生物活性。近年來從 Loring 的實驗室，Sinsheimer 的實驗室，Commoner 的實驗室和早些時 Takahashi 的實驗室用超速離心、电泳和離子交換柱層離等方法都証實現有三種製備核酸的方法（加熱、冷酚和去污劑）所製的 TMV-RNA 是不均一的，其中只有部分的 RNA 有活性。最近 Lippincott 發表用氯化鈉溶液中加熱^[46]，所得的 TMV-RNA 的活性可比其他方法製備的高幾倍，用 Ecteola 離子交換纖維柱進行層析，在 260 毫微米下讀取光密度可以看到七八個峰，測定洗脫液的活性，也顯出其中有三個峰具有活性，用超速離心分段收集，亦得到兩個具有活性的峰，活性最高的正是分子量在 2×10^6 左右的部分。

(2) Fraenkel-Conrat 等認為 TMV-RNA 在製備與貯藏的過程中可能受到污染的宿主的 RNase 的攻擊而降解失活。其次裸露的有活性的核酸分子在侵入宿主体內以後又受到了宿主体內 RNase 的攻擊，以致存活率大為降低。最後能表現出感染症狀的百分率就很低，這種看法，受到了 Commoner 一派人和 Pirie 一派人的反對。

Commoner 等的觀點是^[10]：絕對純粹的 TMV-RNA 未必能構成感染性的充分條件，感染性的表現可能需要某種最低限度量的蛋白質。

Pirie^[55] 曾經用煙葉 RNase 的抑制劑 Zn^{++} 和肝素來防止 TMV-RNA 的失活，在用酚製備時將這些抑制劑加入水相中，若預先將 Zn^{++} 加入，就會阻礙 RNA 進入水相，如在製備終了時加入，並無明顯的穩定作用。使用肝素也不見有阻止失活的效力。因此他認為從宿主葉中帶來 RNase 不是使 TMV-RNA 失活的主要原因。他自己又提出自然失活的看法，認為 TMV-RNA 中

有一些易被空气氧化的东西,由于这些东西的氧化引起核酸失活。

1959年Brownhill, Jones和Stacy等^[5]发现美粘土对酵母RNase有强烈的抑制性。Fraenkel-Conrat和Singer^[19]在用酚制备TMV-RNA将美粘土(Bentonite)加入水相中,所得核酸是非常稳定的。在36°C保温24小时后活性仍无改变,而且比不用美粘土的制品高(此法制备的TMV-RNA的平均感染率为对照的105%)。如果将美粘土加到TMV-RNA溶液中一起接种或在接种前在烟叶先擦美粘土,侵染率可比对照高10倍以上。此外从TMV-RNA对于含RNase很少的Pinto豆叶的感染率,则等于TMV的8%。

(3)从一些生物物理学的观点看来,核酸分子内和分子间的氢键的形成可以使活性降低,前面已提到过Doty, Spirin等的看法,这里不再重复。

Fraenkel-Conrat的工作似仍不能说明美粘土能透过寄主细胞膜去抑制细胞内的RNase。

按Fraenkel-Conrat的实验用金刚砂预先擦破烟叶能增加病毒的感染性11倍而加美粘土到预先擦破的叶上,其感染性则为对照的28倍(本人认为如以28被11除只有2.5倍左右)。另外, RNA + 1 M 磷酸缓冲液,感染性得8倍的增长, RNA + 美粘土 + 1 M 磷酸缓冲液,感染性增至20倍(如果将20用8除正好也是2.5倍。所以美粘土可以增加病毒RNA的感染性2.5倍)。

2. 蛋白质的功能问题 在TMV重组试验中,已说明病毒蛋白对核酸起保护作用,但是蛋白的作用是否仅此而已,这触及生命最基本的物质基础的概念问题,引起了生化学家的激烈争论。

用酚处理和十二烷基硫酸钠处理法制备的核酸,基本上可以认为纯净的。酚制核酸用Sakaguchi反应检查,含蛋白在2%以下,用改良双缩脲反应检查,蛋白含量在0.4%以下,用纸上层离只能看到天门冬酸、谷氨酸、甘氨酸和丝氨酸等四种氨基酸,按此计算为蛋白含量,约为0.25%^[69]。但是用更灵敏的抗病毒血清测定,病毒蛋白含量在0.02%以下^[24]。去污剂制备的核酸,用微

量双缩脲法测定^[97]，蛋白含量在 0.5% 以下，用氨基酸分析法测定，估计蛋白含量为 0.06%，用酚试剂测蛋白其含量为 0.04~0.4%^[58]。

最近 Fraenkel-Conrat^[19] 用酚及美粘土法制备的 TMV-RNA 蛋白含量也为 0.02% 左右，甚至不象有蛋白质存在，从 S³⁵ 标记的 RNA 蛋白计算，也不超过 0.04%，将 S³⁵-病毒用酚及美粘土法处理，确实有 S³⁵ 与 RNA 相结合，无法用乙醇及盐沉淀法使之脱离。但是他把这 RNA 与蛋白重组后再行处理就可除去。由于这一点以及从继续降低蛋白含量并不影响活性看来（照他计算，23 个 RNA 分子才有 1 个亚基蛋白，而它的活性并不比含蛋白为 1% 的 RNA 低），他认为即使还有微量的蛋白存留着，也是与活性无关的。

1958 年 Takahashi^[83] 将酚制核酸用纸连续电泳的方法，进行分段经多次试验发现紫外线吸收峰最高的部分并不是活性最高的。用溴酚蓝染色法鉴定，活性较高部分经常是有蛋白的，另用 S³⁵ 标志的 TMV 制得的核酸，结果也是相同。1959 年 Knight^[43] 从 S³⁵ 标志的 TMV 用酚制法提取核酸，发现有一部分 S³⁵ 牢固地和 RNA 结合在一起，无法脱除，按病毒蛋白计算，含量相当于 0.2%。所以 Takahashi 和 Knight 都反对有活性的核酸可以不含蛋白质的说法。后 Fraenkel-Conrat 从酚及美粘土制备 RNA 的结果推断，认为这个 0.2% 的蛋白含量绝大部分是污染的 RNase。

Commoner 等^[10] 认为(1)有活性的 RNA 必须含有蛋白质，他们计算每个有活性的 RNA 分子应合 20 个蛋白亚基，他们又用重组试验证明，RNA 活性很低的部分并不由于不可逆的失活，经加入病毒蛋白重组后，又显了活性。(2) Fraenkel-Conrat 承认胰蛋白酶能使 TMV-RNA 失活，但是他认为这是由于有 RNase 的污染。Commoner 对此种解释表示怀疑。(3)从混合重组的结果来看，后代虽大致和 RNA 父本相似，但并非完全相同，病毒蛋白和宿主 DNA 组合也能产生感染，可表明蛋白能起作用。(4)抗

病毒血清不能抑制 TMV-RNA 的活性，并不能說明 RNA 中无蛋白，因血清只对高聚状态的 TMV 蛋白是灵敏的。

Lippincott^[46] 用新法制备的 TMV-RNA 活性較其它方法制备的高出多倍，他认为如果 RNA 的感染性是 1%，就表示其中只有 1% 的 RNA 分子是有活性的，按这样算，每个有活性的分子应含有 50 个蛋白亚基。从上述情况看来，这个问题的解决，尚待进一步的研究。

3. 活性核酸的最小单位 按照 Gierer 和 Schramm 的意见，只有分子量为 200 万左右的完整的 TMV-RNA 分子才是有生物活性的。但是 Fraenkel-Conrat^[17] 认为 TMV-RNA 正如 TMV 蛋白一样，也可能是由一些亚基組成的。他的想法是基于以下的观察的：(1) TMV-RNA 在离子强度很高的时候，沉降速度突然降低，显出有分子量比 200 万小得多的 RNA 的存在。(2) 用超声波冲击 TMV 成碎片，然后从它制备 RNA，其活性反而比从整体病毒制得的为高。(3) 用酵母核酸或 H. R.-NA 并合到 TMV-RNA 的稀的溶液中，然后加入蛋白进行重組，則病毒的产生和活性都大为下降。Fraenkel-Conrat 的想法几乎受到許多学者的反对，Gierer 做了一系列的試驗来証明有活性的核糖核酸分子量應該是 200 万左右，而且是单鏈：(1) 他从沉降和粘度測定証明酚制的 TMV-RNA 分子量为 2.1×10^6 和光散射的結果相符。(2) 从 RNase 酶降解的动力学測定分子量的下降求其与感染的关系，也証明是 2.2×10^6 的分子量，而且是一单鏈，鏈的断裂可立刻从粘度和活性的减退表现出来，而无一延迟期。(3) 在 RNase 酶解的时候，測定 546 微毫米旋光和在 260 毫微米測定低色效应的变化亦証明沒有一个延迟期。现在对于 TMV-RNA 是单鏈的大分子已經大致肯定。然而上述 Fraenkel-Conrat 所观察到的事实沒有得到解释。1960 年 Fraenkel-Conrat 还报道了用 RNase 降解而失活的 TMV-RNA 可以恢复部分活性。所以这个问题也需要作更深入的研究，才能明确。

四、核酸结构的改变

(一) 改变核酸结构創造新品种 我們在前面已經提到过,許多化合物可以和核酸作用使其失活或产生新的核酸衍生物品系。各种化学試剂中首先成功地創造出新品种的是亚硝酸。經脫氨以后腺嘌呤成为次黃嘌呤,鳥嘌呤成为黃嘌呤,胞嘧啶成尿嘧啶,其中黃嘌呤和次黃嘌呤都不是自然存在的,而尿嘧啶的生成則使胞嘧啶:尿嘧啶之比发生改变^[70]。前面已經讲过,这样引起的失活作用是一級反应,換句話說如果拿生物活性的降低来代表脫氨的百分数,它和化学反应時間亦是直綫关系。如果N个核苷酸中平均至少要有一个单核苷酸脫氨才能使其失活,在t時間內活性降低状况便應該是:

$$I_t = I_0 e^{-N\alpha t} \quad (1)$$

I_t 是 t 时的活性, I_0 是 $t=0$ 时的活性, α 是每分钟内发生改变的单核苷酸数,在这里N的值可以从感染性的降低和核碱脫氨的速率算出来。据 Schuster 和 Schramm 的計算, $N=3000$, 即 6000 个核苷酸中只要有 2 个的核碱改变就能失活。改变一个核碱也有 50% 的机会使整个分子失活,因为三种核碱脫氨的速率是差不多的,所以亚硝酸脫氨还无法了解哪一种核碱的改变是使它失活。

其次談到新品种的产生。Gierer 和 Mundry^[27] 用經 1M 的亚硝酸鈉在 pH 4.8 和 22°C 处理后的 TMV-RNA 在心形烟叶和爪哇烟叶鉴别新品种是否形成,本来 TMV 在爪哇烟叶上只能形成綠色病, TMV-RNA 經亚硝酸处理后則能在爪哇烟叶上形成痘坏斑。痘坏斑的数目必定和新品种的形成数目成正比。从心形烟叶上和爪哇烟叶上所产生的病斑数又可計算 RNA 质点的成活率。在不同处理時間中产生的变异率,最高达到 15.5% (变异率的計算是在爪哇烟叶上痘坏斑所占綠色病加痘坏斑总数的百分数)。图 5 表示两种不同品系的 TMV 和它們的 RNA 在不同条件下产生变种的情况。

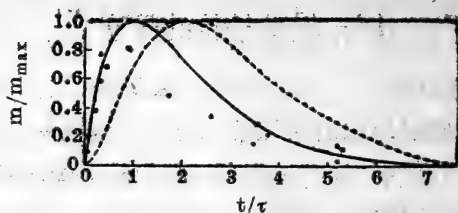


图5 烟草花叶病毒或其核酸与亚硝酸作用后所产生的变种^[27]

m = 变种的浓度; m_{\max} = 最大痘坏斑数; t = HNO_2 作用时间; τ = RNA分子中一个核碱起变化的平均时间。

如果在 3000 个核苷酸中有 1 个核苷酸起了变化，那在所有成活的分子中有 6% 的分子是变异了的话，这表示 6000 个核苷酸中有 180 个核苷酸中的任一个核苷酸就能引起突变。

最近 Tsugita 和 Fraenkel-Conrat^[15] 还报道了二甲基硫酸和 N-溴代琥珀酰胺使 RNA 甲基化和溴化，也都能引起变种。

总的来看用化学引变比物理引变要优越得多，因为化学引变的机制容易知道，而且较易定量和定位，对于遗传讯息传递的研究十分有利。

(二) 核酸的结构与蛋白质合成的关系 作为遗传讯息传递的物质基础，核酸在生物体内的主宰地位已经明确起来，现在遗传学家、生物化学家、生物物理学家正通过核酸结构与蛋白质合成的关系来揭开这个自然界最神秘之谜。

藏在核酸上的密码(即核糖核酸链中核苷酸的排列)对于蛋白的合成具有什么意义，大家亟欲知道的问题由于对于核苷酸排列的知识是如此不够，另一方面关于蛋白质氨基酸序列的材料累积得也很少，要了解上述问题目前还很困难。但有人尝试采用密码的解释方法，如最近由 Woese 提出的从三核苷酸译成氨基酸的“密码簿”^[88]，他是根据 Yčas 对于 6 种病毒^[89] (TMV，番茄丛矮病毒、南方芸豆花叶病病毒、蕪菁黄化病毒、黄瓜病毒及小儿麻痹症病毒)的试验结果拟订的。据他的解释，每一个氨基酸为别的氨基酸代替时，必定至少得有一个三联核苷酸发生变化，据他所列的数

据,能大致解释 Hb α , Hbd, INS, A. B. 及 ACTH 种間的差別,这个问题目前已为不少学者所注意,但还没有肯定的实验結果,本文不拟詳述。

至于蛋白合成的机制,我們可以想象, TMV-RNA 侵入宿主和宿主的細胞核結合后完全打乱了宿主細胞的代謝,結果等于代替宿主細胞核发号施令来命令宿主酶系合成 TMV 所需的核酸和蛋白,这中間的詳細步驟,正是需要进一步探討的重要問題之一。

五、結 束 語

(一) 作为生命的最基本的小单位, TMV 核酸的研究已替我們为生物学掘发了不少珍貴的宝藏和开辟了广闊的园地。

(二) 核酸作为遗传訊息的传递者及最基本的生命物质,从 TMV-RNA 研究的角度看来,地位是巩固的,但是蛋白的地位恐怕还需更多更精的实验才能否定它分享主宰的地位。

(三) 訊息控制品密碼的翻譯問題,目前的看法是不成熟的,离开全盘解决还是很遙远,需要組織大量的科学家从事研究。

参 考 文 献

- [1] Anderer, F. A., Uhlig, H., Weber, E. and Schramm, G., *Nature*, 186: 922, 1960.
- [2] Beodtke, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 32: 519, 1959.
- [3] Beodtke, H., *J. Mol. Biol.*, 2, 171, 1961.
- [4] Brenner, S. and Horne, R. W., *Biochim. Biophys. Acta*, 34: 103, 1959.
- [5] Brownhill, T. J., Jones, A. S. and Stacey, M., *Biochem. J.*, 73: 434, 1959.
- [6] Casfer, D. L. D., *Nature*, 177: 928, 1956.
- [7] Cheo, P. C., Frieser, B. S. and Sinsheimer, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, 45: 313, 1959.
- [8] Commoner, B., Lippincott, J. A., Shearer, G. S., Richman, E. E. and Wu, J. H., *Nature*, 178: 767, 1956.
- [9] Commoner, B., Shearer, G. B. and Strode, C., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, 44: 1117, 1958.
- [10] Commoner, B., *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Vienna, (1958)*, 7:

17, 1959.

- [11] Doty, P., Beodtker, H., Fresco, R., Hoselkorn, R. and Litt, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **45**: 482, 1959.
- [12] Fraenkel-Conrat, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **15**: 307, 1955.
- [13] Fraenkel-Conrat, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 882, 1956.
- [14] Fraenkel-Conrat, H., *Viol.*, **4**: 1, 1957.
- [15] Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B., *Biochim. Biophys. Acta*, **24**: 540, 1957.
- [16] Fraenkel-Conrat, H., Singer B. and Williams, R. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **25**: 87, 1957.
- [17] Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B., *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem.*, Vienna (1958), **7**: 9, 1959.
- [18] Fraenkel-Conrat, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **47**: 169, 1961.
- [19] Fraenkel-Conrat, H., and Singer, B., *Viol.*, **14**: 56, 1961.
- [20] Franklin, R. E., *Nature*, **177**: 929, 1956.
- [21] Franklin, R. E., Klug, A. and Holmes, K. C., "The Nature of Viruses", 39, 1957 (J. and A. Churchill, London).
- [22] Gavrilova, L. P., Spirin, A. S. and Belozersky, A. N., *Doklady, Akad. Nauk. S. S. S. R.* **124**: 933, 1959.
- [23] Gavrilova, L. P., Spirin, A. S. and Belozersky, A. N., *Doklady, Akad. Nauk. S. S. S. R.* **126**: 1121, 1959.
- [24] Gierer, A. and Schramm, G., *Z. Naturf.*, **11 B**: 138, 1956.
- [25] Gierer, A., *Nature*, **179**: 1297, 1957.
- [26] Gierer, A., *Z. Naturf.*, **13 B**: 485, 477, 1958.
- [27] Gierer, A. and Mundry, K. W., *Nature*, **182**: 1457, 1958.
- [28] Ginoza, W. and Norman, A., *Nature*, **179**: 520, 1957.
- [29] Ginoza, W., *Nature*, **181**: 958, 1958.
- [30] Gish, D. T., Ramachandran, L. K. and Stanley W. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**: 433, 1958.
- [31] Hart, R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **28**: 457, 1955.
- [32] Hart, R. G., *Viol.*, **1**: 402, 1955.
- [33] Hart, R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **41**: 261, 1955.
- [34] Hart, R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **43**: 457, 1958.
- [35] Hart, R. G., *J. Mol. Biol.*, **3**: 701, 1961.
- [36] Haschmeyer, R., Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **45**: 313, 1959.
- [37] Holden, M. and Pirie, N. W., *Biochem. J.*, **60**: 53, 1955.
- [38] Hopkins, G. R. and Sinsheimer, R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **17**: 476, 1955.

- [39] Huxley, H. E., Proc. Stockholm Conf. on Eletron Microscopy, 260, 1959 (Almgvist and Wilksells, Stockholm).
- [40] Iwanowsky, D. M., Bull. l' Acad. Imp. Sci., 35: 67, 1892.
- [41] Knight, C. A., J. Biol. Chem., 197: 241, 1952.
- [42] Knight, C. A. and Woody, B. R., Arch. Biochem. Biophys., 78: 460, 1958.
- [43] Knight, C. A., Plant Pathology, Problems and Progress, 470~476.
- [44] Koshland, Jr., D. E., Simmons, N. S. and Watson, J. D., J. Am. Chem. Soc., 80: 105, 1958.
- [45] Lippincott, J. A. and Commoner. B., Biochim. Biophys. Acta, 19: 198, 1956.
- [46] Lippincott, J. A., Virol., 13: 348, 1961.
- [47] Loring, H. S., Waritz, R. S., Sci., 125: 646, 1957.
- [48] Loring, H. S., Al-Rawi, S. and Fujimoto, Y., J. Biol. Chem., 233: 1415, 1958.
- [49] Loring, H. S., Fujimoto, Y. and Eng, L. F., Proc. Natl. Acad. Sci., US, 45: 293, 1959.
- [50] Matthews, R. E. F. and Smith, J. D., Adv. Virus Res., 3: 49, 1955.
- [51] McLaren, A. D. and Takahashi, W. N., Fed. Proc., 16: 220, 1957.
- [52] Narita, K., Biochim. Biophys. Acta, 30: 352, 1958.
- [53] Niu, C. I. and Fraenkel-Conrat, H., Biochim. Biophys. Acta, 16: 597, 1955.
- [54] Nixon, H. L. and Woods, R. D., Virol., 10: 157, 1960.
- [55] Pirie, N. W., Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Vienna (1958), 7: 45, 1959.
- [56] Ramachandran, L. K., Virol., 5: 244, 1958.
- [57] Ramachandran, L. K., and Narita, K., Biochim. Biophys. Acta, 30: 616, 1958.
- [58] Ramachandran, L. K. and Fraenkel-Conrat, H., Arch. Biochem. Biophys., 74: 224, 1958.
- [59] Reddi, K. K., Biochim. Biophys. Acta, 25: 528, 1957.
- [60] Reddi, K. K., Nature, 182: 1308, 1958.
- [61] Reddi, K. K., Proc. Natl. Acad. Sci. US, 45: 293, 1958.
- [62] Reddi, K. K., Biochim. Biophys. Acta, 27: 1, 1958.
- [63] Reddi, K. K., and Knight, C. A., J. Biol. Chem., 221: 629, 1956.
- [64] Reddi, K. K., Biochim. Biophys. Acta, 24: 238, 1957.
- [65] Reddi, K. K., Biochim. Biophys. Acta, 32: 386, 1959.
- [66] Reddi, K. K., Nature, 188: 60, 1960.
- [67] Rushingky, G. R. and Knight, C. A., Proc. Natl. Acad. Sci. US, 46:

945, 1960.

- [68] Schramm, G., Schumacher, G. and Zillig, W., *Z. Naturf.*, **10 B**: 431, 1955.
- [69] Schuster, H., Schramm, G. and Zillig, W., *Z. Naturf.*, **11 B**: 339, 1956.
- [70] Schuster, H. and Schramm, G., *Z. Naturf.*, **13 B**: 697, 1958.
- [71] Schuster, H., *J. Mol. Biol.*, **3**: 447, 1961.
- [72] Shugar, D. and Wierchowshi, K. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **23**: 657, 1957.
- [73] Siegel, A., Wildman, S. G. and Ginoza, W., *Nature*, **178**: 1117, 1956.
- [74] Siegel, A., *Nature*, **180**: 1430, 1957.
- [75] Spirin, A. S., Gavrilova, L. P., Bresler, S. E. and Mosevitsky, M. I., *Biokhimiya*, **24**: 938, 1959.
- [76] Spirin, A. S., Gavrilova, L. P., and Belozersky, A. N., *Doklady, Akad. Nauk. S. S. S. R.*, **125**, 658: 1959.
- [77] Spirin, A. S. and Belozersky, A. N., *J. Mol. Biol.*, **2**: 436, 1960.
- [78] Spirin, A. S., *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem. Moscow*, **3**, 96, 74, 1961.
- [79] Stachelin, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **31**: 448, 1959.
- [80] Stanley, W. M., *Sci.*, **81**: 644, 1935.
- [81] Stanley, W. M., *Sci.*, **83**: 626, 1936.
- [82] Takahashi, W. N., *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Vienna (1958)*, **7**: 85, 1959.
- [83] Tanaka, K. and Usami, T., *J. Biochem. (Japan)*, **45**: 511, 1958.
- [84] Tsugita, A. and Fraenkel-Conrat, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**: 636, 1960.
- [85] Wacker, W. E. C. and Vallee B. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 3257, 1959.
- [86] Wang, S. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **60**: 6199, 1958.
- [87] Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, F., *Z. Naturf.*, **7 B**: 148, 1952.
- [88] Woese, C. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **5**: 88, 1961.
- [89] Yčas, M., *Nature*, **188**: 209, 1960.

第九讲 感染性核酸——病毒

生物学特性的基础

柳 元 元

中国医学科学院病毒学系

一、引 言

1952年 Hershey 和 Chase^[49] 观察到大肠菌噬菌体在吸附于细菌表面以后，先将其脱氧核糖核酸 (DNA) 注入细菌的细胞内，然后发生感染。1954年 Tamm 等^[96] 观察到流感病毒的繁殖与宿主细胞中核酸代谢有密切关系。1956年 Gierer 和 Schramm^[41] 及 Fraenkel-Conrat^[33] 分别用酚及十二烷基磺酸钠成功地从烟草花叶病毒提出有感染性的核糖核酸。当将此 RNA 制剂接种在烟草叶上时，可产生和原来病毒一样的疾病，也即能生成和亲代病毒具有相同生物学性质的子代病毒。

此后的数年内许多学者曾利用类似的方法从许多种动、植物病毒或受其感染的组织中成功地提出了感染性 RNA。例如：西尼罗脑炎、Mengo 脑炎、假性脑脊髓炎、脊髓灰白质炎、柯萨奇、ECHO、脑心肌炎、东方及西方马脑脊髓炎、壁虱脑炎、乙型脑炎、鼠脑脊髓炎、Semliki 脑炎、口蹄疫和流感等病毒的 RNA，少数小白鼠和人的肿瘤病毒的 DNA 等。

1957年 Fraser 等^[87] 报告，在适宜的实验条件下也可以用人工的方法将噬菌体的 DNA 提出，接种到细菌培养液中，使细菌受染。最近 Mayer 等^[71] 报告从 λ 噬菌体提到感染性 DNA，Gerber 报导^[39] 从 SV₄₀ 病毒提得感染性 DNA。

由于病毒的 RNA (或 DNA) 能够在易感的动、植物机体或

細胞內繁殖,引起和原来病毒一样的特异性感染,因此病毒核酸已普遍地被认为病毒感染性的物质基础。此外曾观察到当用亚硝酸处理某些病毒的 RNA 时,产生了一定程度的脱氨作用,因此导致其子代病毒某些生物学性质的改变。这使人考虑到病毒核酸的分子结构与病毒的遗传及变异有密切关系。因此許多实验室对病毒核酸进行研究,目的在探索病毒核酸的物理化学性质——特别是分子结构与病毒的生物学特性(包括感染性、抗原性、遗传性和变异等)相互間的內在联系。到目前为止这些研究的结果綜合起来可以分为下列几个方面。本文着重綜合有关动物病毒核酸方面的研究材料,來說明病毒核酸和病毒生物活性的关系。

二、病毒核酸与病毒感染性的关系

(一) 感染性 RNA 的分离和提取 Gierer 和 Schramm 用酚的饱和溶液和 Fraenkel-Conrat 用十二烷基磺酸钠提取烟草花叶病病毒 RNA 所获得的结果基本上是相似的。RNA 的感染滴度一般为原来的 1% 左右。这二种方法的提取机制不同。酚的提取机制主要有两个方面:(1)沉淀蛋白质,抑制組織中核糖核酸酶(RNase)的作用;(2)使病毒 RNA 溶解在酚的饱和溶液中。使用十二烷基磺酸钠时,必須利用硫酸铵沉淀蛋白质。Bachrach (1961) 认为,十二烷基磺酸钠本身的作用在于抑制 RNase 的活性,而保存悬液中病毒 RNA 的感染性。

Wecker^[102], Sander^[87], Nakamura^[74] 曾利用加热的酚溶液提取 WEE、登革热、日本脑炎、鼠脑脊髓炎和脑心肌炎等病毒的 RNA 获得成功。在若干情况下,用加热的酚所提出的 RNA 具有比較高的感染滴度。

Bachrach^[9] 直接将口蹄疫病毒制剂加热,也获得感染性 RNA。他认为热可分解病毒核蛋白质而使感染性 RNA 游离。但是在加热以前必須先抑制病毒制剂中 RNase 的作用。

Kaper 和 Steer^[56] 用加热到 95~100°C 的 1 M NaCl 溶液提取烟草环斑病病毒的感染性核酸。Lippincott^[64] 将 TMV 加

热到 $98\sim 98.5^{\circ}\text{C}$ 也提得感染性 RNA。这种处理的机制可能与 Bachrach 的热处理实验相同,主要是利用热的分解作用,而 1 M NaCl 的作用则在于抑制 RNase 的活性。

利用胍降解或尿素处理若干植物病毒^[82]也曾获得感染性 RNA。但是这些方法未见应用于动物病毒。

并非对所有的动物病毒都已经成功地提出感染性 RNA。对流感新城鸡瘟一类病毒的尝试多数获得失败的结果,虽然 Portocala 等^[77, 78]和 Maassab^[66]均报告曾成功地从某些流感毒株提出感染 RNA。

少数学者对病毒 RNA 本身是否确实具有感染性,抑或这种感染性是由于所提取的 RNA 不纯净,其中还混杂有少数完整病毒颗粒之故起初曾加以怀疑,因为用目前的方法提出的 RNA 制剂中一般至少尚含有 $0.03\sim 0.05\%$ 的蛋白质。但是经过利用蛋白水解酶及 RNase 的处理研究如 Alexander 等^[4],以及 Fraenkel-Conrat 等^[84]用同位素 S^{35} 标志 TMV 病毒蛋白质然后提取 RNA,再用皂土提纯 RNA 而加以分析,结果都证明 RNA 本身确实有感染性,并非由于夹杂有病毒颗粒之故。关于这个问题,下面还要加以讨论。

(二) 提取感染性病毒核糖核酸的材料来源 在发现并初步肯定了病毒 RNA 本身具有感染性以后,首先可以提出如下的问题:感染性核酸是从什么材料中提出来的?对于这个问题可以有三个不同的答案:(1)从完整的病毒颗粒中提出的;(2)从病毒合成过程中所产生的特殊感染性物质中所提出的,这些物质可能不被括入完整的病毒颗粒中;(3)自游离的病毒 RNA 提出。

有不少材料可供说明游离 RNA 的存在。Brown 和 Stewart^[15]用口蹄疫病毒感染豚鼠足掌,在黑暗期内,受染组织中尚未见有新病毒颗粒的形成,但是此时已能从组织中分离到感染性 RNA (表 1)。Brown 和 Stewart^[16]进一步证明口蹄疫病毒的感染性 RNA 在完整的病毒颗粒形成之前半小时已经可被测知即以游离状存在,以后此游离状 RNA 的量随着完整病毒颗粒的增加而减少。

表1 口蹄疫病毒感染豚鼠足掌后,感染性 RNA 和完整病毒出现的速率^[15]

感染后时间 (小时)	RNA 滴度(組織培养滴定)		病毒滴度(小白鼠滴定)	
	足掌組織細胞	上 清 液	足掌組織細胞	上 清 液
0	—	—	1.8	2.7
1	2.2	—	1.5	3.3
1.5	3.2	—	1.8	3.3
2	3.2	2.2	4.5	4.5
3	3.2	2.2	5.5	5.8

— 表示无感染滴度。

Engler 和 Schramm^[30], Hansen 和 Schafer^[47] 分别研究 TMV 和鼠脑脊髓炎感染性 RNA 的合成动态, 均看到在完整病毒未出现以前已能分离到感染性 RNA (图 1 a, b)。

Sanders^[87] 报告, 在脑心肌炎病毒感染后 15 分钟时, 即能分离到感染性 RNA, 其滴度在感染后 5 小时达到最高。而完整的病毒于感染后 4 时出现, 于 7~8 时达到最高。Holland 等^[53] 和 Darnell 等^[22] 也观

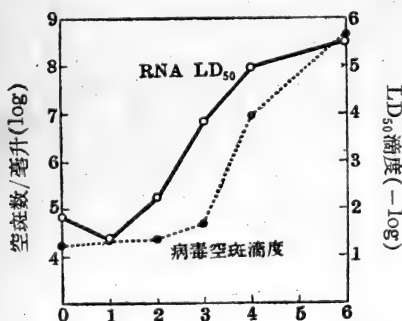


图 1a 鼠脑脊髓炎病毒及其感染性 RNA 合成速率的比较^[47]

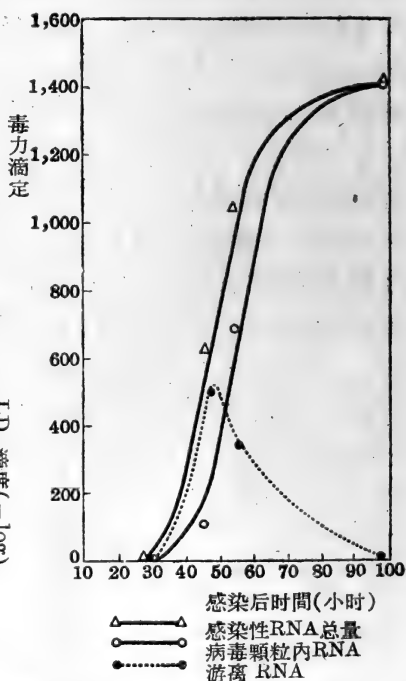


图 1b TMV RNA 的生成动态^[30]

察到脊髓灰白质炎病毒的感染性 RNA 的合成比完全的病毒颗粒早半小时。

除了证明在若干病毒感染的组织中有游离 RNA 的存在外，有一些实验证明，不能从完全的病毒颗粒中提出感染性 RNA。

Huppert 和 Sanders^[55] 报告用脑心肌炎病毒感染贅瘤细胞，然后用高速离心沉淀此细胞悬液并提纯病毒，再用酚提取各个部分中的 RNA，发现在精制的沉淀物或病毒制剂中只能提出滴度较低的 RNA 或甚至未能提出任何有感染性的 RNA。用 10,000 转/分的速度沉淀 1 小时，使上清液中病毒的滴度减少 2000 倍，但其感染性 RNA 的滴度只降低 1 倍，而在精制的病毒制品中，病毒的滴度提高 10 倍，但是未能从其中提出感染性 RNA (表 2)。Richter 和 Clark^[58] 研究 EEE 病毒，同样不能从病毒颗粒本身分离到感染性 RNA。虽然 Sanders^[87] 认为用热的酚处理可以从完整的病毒颗粒中提出感染性 RNA (例如热酚提取法可以从成熟的 TMV 颗粒中提出感染性 RNA)，而冷酚则仅能提到游离 RNA。但是根据 Koch 等^[59] 研究精制脊髓灰白质炎病毒及其粗制品，Nakamura^[74] 研究登革热和日本脑炎病毒，用冷酚和热酚处理的结果均无明显差别。在我们的实验室中，用热酚提取日本乙型脑炎 RNA 时，其感染滴度似反而稍逊于冷酚。用热酚处理的结果当然决定于该病毒 RNA 本身的对热稳定性。

表 2 不同纯净度的脑心肌炎病毒制剂中所含
感染性 RNA 的量^[55]

病毒培养液处理方法	病毒滴度(PFU)	RNA滴度(MID ₅₀ /毫升)
原培养液	5.8×10^8	6.3×10^3
培养液以 1 万转/分离心一小时的上清	2.2×10^5	3.0×10^3
培养液以 1 万转/分离心一小时的沉淀	1.2×10^8	0.16×10^3
培养液以 1 万转/分离心一小时的沉淀 经洗涤浓缩精制	5×10^9	0

Huppert 和 Sanders^[55] 提出另一种看法，他们以为感染性核酸可以从不被括入完整病毒颗粒中的特异性物质中提出。这些

物质是在病毒合成过程中首先合成的某些前体，它們带着病毒的遗传信息。

Franklin 等^[36] 研究，在用酚处理鼠脑脊髓炎病毒感染的鼠脑組織之前，先加入 RNase 处理，并不影响感染性 RNA 的提出量。这說明，該病毒 RNA 不是游离存在的，而是存在于对 RNase 有抵抗的核蛋白质之中。

Schottissek 和 Roth^[90] 深入研究鸡痘病毒在鸡胚羊膜腔繁殖时感染性 RNA 的生成动态，看到在感染 2 小时后感染性 RNA 即开始合成，但是可以用特异性抗体吸收。分析的结果証明这些 RNA 是和可溶性抗原同时生成并結合在一起的。但此时尚未形成完整的病毒顆粒。

在我們的实验室中观察到，用乙型脑炎病毒感染小白鼠 48 小时后，动物脑組織中病毒的滴度已經达到 $10^{6.5}$ ，但尚未能分离到感染性核酸(或滴度很低)；在感染 72~96 小时后，随着病毒滴度的升高，所提出 RNA 的感染滴度也比例地增加。这个实验表明，从受感染鼠脑組織中所能提出的脑炎病毒感染性 RNA 的量是与組織中所含完整病毒的量成比例的(图 2)。

另一方面，若干作者証明，用各种物理学化学的方法使病毒灭活，仍可从其中提出感染性 RNA。

Bachrach^[7] 将口蹄疫病毒在 100°C 加热 5 分钟使之灭活(此

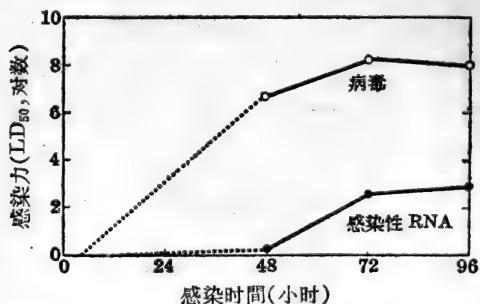


图 2 乙型脑炎病毒及其感染性 RNA 在小白鼠脑組織中的比例

时病毒材料可能完全不呈感染性，說明沒有活病毒和游离的感染性 RNA 存在)，然后用酚提取，仍获得感染性 RNA。Klingler 和 Chapin^[58] 用 5% 酚灭活脊髓灰白质炎病毒，Nakamnra^[73] 用在 55°C 加热 60 分钟灭活鼠脑脊髓炎病毒，Ada 和 Anderson^[8] 在 60°C 加热 20 分钟、用稀酚处理及低 pH 作用使 Murray 谷热灭活，結果均能提出感染性 RNA。Rappaport^[80] 用免疫血清来中和 TMV 的感染力后也仍能分离出感染性的病毒 RNA。

以上实验說明，感染性病毒 RNA 可以从对 RNase 有抵抗的或能被特异性抗体中和的核蛋白质、病毒 RNA——抗原的結合体、甚至从成熟的病毒顆粒本身提出。

根据这些材料，我們获得如下的概念：不同病毒的感染性 RNA 的提取材料不必一致，某些病毒可能存在着游离 RNA，容易被提出；另一些病毒可能缺乏游离 RNA，但是可以成功地从成熟的病毒顆粒中提出，或从含有感染性 RNA 的特异性物质中提出；有些病毒(如 TMV)可能含有游离 RNA 同时也可以从病毒顆粒中提出感染性 RNA。

有些病毒，其成熟的顆粒可能受到某种物质的保护，而不易从其中提取感染性 RNA。例如 Richter 和 Clark^[88] 认为 EEE 病毒顆粒的表面包着一层类脂质，这可能妨碍感染性 RNA 的提出。流感病毒的表面也含着不少类脂质，这是否为流感一类病毒不易提得感染性 RNA 的原因，尚不了解。但是 Portocala 等^[77,78] 曾指出，需先将精制的流感病毒用乙醚脱脂，始能成功地提出它的感染性 RNA。

据 Drayton^[25] 报告，磷脂酶 A 能将 Rous 肉瘤病毒灭活，該作者因此考虑到 Rous 病毒的生物活性是否依赖于其核酸与磷脂蛋白的結合体；破坏了这种結合体，便破坏了病毒的毒力。在流感病毒方面是否也可能有同样的情况，因此不易提出感染性 RNA。

(三) 影响感染性核糖核酸滴度的因素 对病毒 RNA 的感染性可以提出第二个問題：病毒的感染性是否完全决定于或主要决定于其 RNA。换言之，病毒 RNA 是否为病毒感染性的唯一

的或主要的化学基础？

Fraenkel-Conrat, Gierer 和 Schramm 及 Engler 等所提得的 TMV-RNA 的感染滴度仅及原病毒滴度的 1/100 左右。其后用不同方法提到的各种动物病毒 RNA 的感染滴度一般在原病毒滴度的 1/1000~1/100,000 范围内。由此看来，从所有动、植物病毒或其受染组织提到的 RNA 滴度都很低，远未能代表原病毒的全部感染力。

病毒 RNA 的感染力为何这样低呢？可能有下面的几个原因：

1. 在提取过程中大部分感染性 RNA 未能被提出，在量的方面受到损失。

2. 在提取过程中，虽然绝大部分的 RNA 可被提出，但是受到细胞核糖核酸酶的分解破坏或由于细胞别的抑制因素而遭到损失。

3. 提取方法本身不理想，提取时破坏了 RNA 分子的某些活性基团或结构（例如一级结构），因此被灭活。

4. 由于提取过程破坏了 RNA 和蛋白质、氨基酸或其他物质的结合，因此降低了 RNA 的感染性。

5. 病毒 RNA 的感染机制和繁殖机制与完整病毒不同。

关于病毒 RNA 的感染机制和完整病毒的感染机制有无差别目前研究得不多，一般认为无明显差别。虽然 Schramm 等^[91]曾观察到用 TMV-RNA 感染敏感植物时，潜伏期比完整病毒缩短了 10~12 小时，但仍需要经过一个黑暗期以及其他繁殖阶段。

为了了解病毒 RNA 低感染力的原因，许多作者进行了各种试验。

Holland 等^[58]用 P³² 标志脊髓灰白质炎病毒的 RNA，再用酚提取，发现几乎全部放射性都可以被提出。其中 97~99% 属于可被酸及乙醇沉淀的大分子 RNA。该作者们认为低感染力不是由于提取时量的损失。但是当用所提出的 RNA 感染 HeLa 细胞时，他们发现，只有不到 1% 的放射性被细胞所吸收，在剩液中 RNA

表 3 HeLa細胞对脊髓灰白质炎病毒感染性RNA的吸附作用^[53]

吸附时间(分钟)	上清液中剩余的同位素比活性		被吸附量(%)
	在2M MgSO ₄ 中	在1M NaCl 中	
0(对照)	141	154	
5	154	164	<10
10	138	170	<10

的滴度从 1 万个单位降到 180 单位。所以他們认为所提出的RNA中大部分RNA是沒有感染性的(表 3)。

在病毒顆粒中一部分 RNA 沒有感染性的情况是可能的。Ada 和 Perry^[2] 报告流感病毒絲状体所含的 RNA 比球形顆粒多 8 倍,并指出这些多余的 RNA 与宿主的 RNA 有密切关系。

如果病毒 RNA 是病毒感染性的唯一的物质,它們必須能表现原病毒的大部分感染力。除非是由于有些完整的病毒顆粒中的 RNA 不易被提出,在这种情况下从病毒顆粒中提出的 RNA 的感染力当然是很低的。

許多实验証明了細胞 RNase 对 RNA 的感染性有破坏作用。Norman 和 Veomett^[75] 报告,用 P³² 标志 HeLa 細胞的 RNA,然后将其接种到 HeLa 細胞培养上,30 分钟后,有 5~8% 的 RNA-磷被降解而出现于低分子化合物中。

Sprunt 等^[94] 观察到用 0.9 M 的 NaCl 或 KCl 溶液稀释脊髓灰白质炎病毒 RNA 时,其感染滴度比用等渗盐水稀释时有明显增加。Koch 等^[59] 看到脊髓灰白质炎病毒RNA的滴度在 0.4 M NaCl 中比在 1 M NaCl 中低 100 倍。如先用 0.6 M NaCl 將細胞洗过然后接种 RNA,則滴度比不洗的高 5 倍。

为了了解高浓度的 NaCl 溶液能提高 RNA 感染滴度的原因是否与渗透压有关,Ellem 和 Colter^[27] 报告用不同浓度的 NaCl 和蔗糖溶液稀释 Mengo 脑炎 RNA,然后感染細胞。观察到随着 NaCl 和蔗糖浓度的增加,RNA 的感染滴度也提高了。在 0.7 M 左右时,感染滴度最高(图3)。但是 0.7 M 的蔗糖和 0.37 M 的盐溶液对原病毒則有强抑制作用。作者解释高渗盐水可能抑制

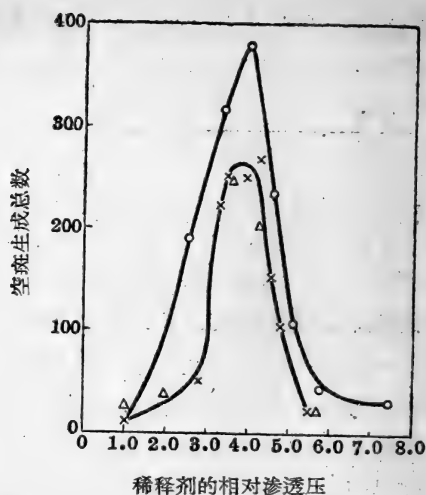


图3 渗透压对 Mengo 脑炎 RNA 在 L 细胞上生成空斑数的影响^[27]。

○——○ 蔗糖溶液； ×——× NaCl-磷酸缓冲液。

细胞 RNase 的作用，从而提高其滴度。Holland 等^[58] 用 2 M $MgSO_4$ 或 1 M 枸橼酸盐代替 NaCl，也获得较高的滴度。

有些研究者很重视 RNase 对 RNA 感染力的影响，甚至 Herriot 等^[48] 认为，在动物机体内，RNase 活性的水平与病毒性感染之所以发展为有临床症状的或潜伏或隐性的感染等过程有关，而机体的不同生理状态则影响体内 RNase 的活性。

Sprunt 等^[93] 用等渗盐水洗 HeLa 细胞，测知洗液中有 RNase 活性。用高渗盐水(1.4M NaCl)洗过后，RNase 活性便不能测出。他们分别用高渗盐水和含有酵母 RNA 的等渗盐水洗细胞，然后将用等渗盐水稀释的脊髓灰白质炎病毒 RNA 接种。在这种情况下，用酵母 RNA 洗过的细胞培养已无 RNase 存在，接种后上清液中剩余的脊髓灰白质炎病毒 RNA 活性与用高渗盐水洗过的无大差别，但是细胞仍不易被感染。该作者认为，细胞 RNase 虽然有一定作用，但是还有其他因素存在。

在我们的实验室中观察到，用低渗 NaCl 溶液或蒸馏水稀释

乙型脑炎 RNA 时,感染滴度均比用等渗溶液稀释时高几十倍(但是仍比用高渗盐水稀释时低约 10 倍)。因此我们考虑,除了 RNase 的作用外,细胞膜对病毒 RNA 的吸附及通透性可能与其滴度有关,而渗透压的改变可影响细胞膜,因此影响细胞对病毒 RNA 的吸附。例如 Ellem 和 Colter^[28] 研究,用 P^{32} 标志脊髓灰白质炎病毒的 RNA 再用不同浓度的 NaCl 溶液稀释。当用 0.14 M NaCl 稀释时在 HeLa 细胞上的吸附量为 0.107%, 而用 0.64 M NaCl 稀释时增加到 0.819%。另一方面 Fraenkel-Conrat 等^[34] 观察到用皂土或金刚砂磨擦烟草的叶面,然后接种 TMV-RNA,可以提高 RNA 的感染力。这可能主要是由于细胞膜表面受损伤之故(但是该作者仅解释为这是由于上述物质抑制了细胞 RNase 活性之故。)

细胞对病毒 RNA 的吸附是很快的,一般在短时间内即完成。如脊髓灰白质炎病毒 RNA 在猴肾及人羊膜细胞上的吸附时间只需 7 分钟^[4], Mengo 脑炎 RNA^[28] 在 HeLa 细胞上的吸附只需 15 分钟,延长接触时间并未能增加吸附量。Ellem 和 Colter^[28] 报告, HeLa 细胞对 Mengo 脑炎 RNA 的吸附,在 17°C 时比在 37°C 为低。该作者认为在细胞中存在着对 RNA 的吸附不利的作用过程。对这些过程的本质尚未阐明。

除了上述盐类外, Dubes 和 Klinger^[26] 报告一些在水中溶解度低的物质也能影响病毒 RNA 的感染力。如加 $CuHPO_4 \cdot 2H_2O$ 于脊髓灰白质炎病毒 RNA——猴肾细胞培养中,可使滴度提高 10 倍。其机制未明。

由此可见, RNase 的作用不是病毒 RNA 低滴度的唯一原因,除了酶的作用和细胞本身的一些别的因素外,是否还可以考虑在提取过程中 RNA 分子某些活性基团遭受破坏或 RNA 与别的物质结合体遭受破坏的可能性?

Bachrach^[8] 报告,用十二烷基磺酸钠及酚提取口蹄疫病毒 RNA,观察到在第 1 次酚提取时 RNA 的滴度为 $10^{-5.0}$, 第 2 次降为 $10^{-3.3}$, 第 3,4 次为 $10^{-2.2}$ 。在这些制剂中均无完整病毒存

在。在我們的實驗室中則觀察到，提取乙型腦炎 RNA 時，經兩次酚處理後 RNA 的滴度為 $10^{-3.5}$ ，4 次處理時降到 $10^{-1.0}$ ，6 次處理時降到 $10^{-0.75}$ 。多次酚處理顯然降低 RNA 的滴度。酚處理能破壞 RNA 自身的結構或破壞 RNA 和別的物质結合尚無實驗證明，但是多次酚處理能降低制品中的蛋白質的含量則是肯定的。

Huppert 和 Sanders^[55] 提出一種看法：完整的病毒顆粒同時含有遺傳物質及引起感染的“板機”(trigger)，而它的 RNA 則只含有遺傳物質而缺乏這種“板機”。根據他們這種看法，必須研究用各種劑量的病毒或 RNA 感染時，各種病毒物質的合成量、速率有何不同，以及所謂“板機”的化學基礎。了解這些問題有助於闡明 RNA 感染性的實質。

Holland 等^[59] 認為病毒的感染性 RNA 單鏈可能必需與某些特定物質相結合，任何對這種結合的破壞，必然導致其感染性的降低。

Franklin 和 Wecker^[55] 觀察到羥胺可以使某些病毒 RNA 滅活（如西方馬腦脊髓炎、鼠腦脊髓炎和雞痘等）。根據 Zachan 等^[107] 的研究，羥胺可以分解氨基醯基酯，因此 Franklin 等考慮，若干病毒的感染性 RNA 是否與氨基酸結合在一起。有如可溶性 RNA——氨基酸複合體一樣。由於病毒 RNA 的分子量在 200 萬左右，要測定少數氨基酸的存在是很困難的。Franklin 等觀察到，病毒 RNA 在 pH 5~7 時對熱比較穩定而在 pH 8 時則很不穩定，這種性質和氨基醯基酯相似。由此看來，病毒的感染性 RNA 有含氨基酸的可能。

病毒核酸的感染性是否與蛋白質有關呢？在噬菌體方面，French^[38] 觀察到噬菌體在注射 DNA 時同時注射了約 3% 的蛋白質到菌體內，其中約 1% 的氨基酸能傳給子代。

在植物病毒方面，Fraenkel-Conrat^[33] 觀察到如果在 TMV-RNA 制剂中加入適量的 TMV 蛋白，便可重新獲得杆狀的顆粒。重新結合的制品感染力比 RNA 增加了 200 倍左右。Santilli

等^[66]也获得类似的实验结果，并证明随着加入蛋白质质量的增加，可延长制品的潜伏期，接近于完整病毒。

上述 Drayton^[25]也考虑到 Rous 病毒核酸与磷脂蛋白结合始有感染性的可能性。

由于现在所用提取感染性核酸的方法还不能除去全部病毒蛋白质。虽然能除去绝大部分的蛋白质但仍留下极少量的蛋白质，同时也仅仅留下很低的感染力。因此有些作者认为虽然病毒核酸是病毒感染力的主要基础，但是蛋白质仍然起一定的作用，常称这些蛋白质为内在蛋白质。Lippincott^[64]最近研究 TMV-RNA 的感染性，也认为对病毒蛋白质的作用仍需进一步加以探讨。

根据以上材料，目前尚难对病毒 RNA 低感染力的原因作出结论。在某些情况下，若干病毒颗粒中的感染性 RNA 可能未被全部提出；其次，细胞 RNase 的作用以及细胞的生理状态对 RNA 的感染可能有一定的影响；在另一方面，需要进行很多实验以阐明 RNA 感染性的实质，如病毒 RNA 的分子结构和构型，以及 RNA 与别的物质（特别是与氨基酸或蛋白质）的结合和 RNA 感染性的关系。在未能解决这一问题以前，我们在进行感染性病毒 RNA 的研究中所下的结论，正如 Holland 等^[68]所指出，必须采取审慎的态度。因为实际上，在目前所能获得的最纯净病毒 RNA 制剂中，其真正具有感染性的成分常不到 1%。

但是可以认为感染性核酸，RNA 或 DNA，确是病毒感染性的主要物质，因为单独病毒的蛋白质部分是不具感染性的。

三、感染性核酸和病毒的遗传、变异的关系

（一）感染性核糖核酸及其所合成的病毒与原毒株生物活性的差异 一般认为 RNA 和 DNA 都带有遗传信息。如果病毒 RNA 决定病毒的遗传性质，RNA 本身及用 RNA 感染细胞以后所生成的子代病毒便应该和原来的病毒性质完全相同——包括对细胞的感染性、抗原性及其它生物学性质等；另一方面不同毒

株的核酸結構应有差別。

不少實驗証明用病毒的 RNA 感染易感細胞或动物以后，所生成的子代病毒具有与原来病毒相似的抗原性，可被原来病毒的抗血清所中和 (Brown 等^[19]; Anderson 和 Ada^[5]; Mountain 和 Alexander^[72])。但是有些病毒的 RNA 对細胞的感染范围，却比原病毒較广。

De Somer 等^[28] 报告脊髓灰白质炎 I 型病毒株的 RNA 对猴腎細胞培养來說，其感染滴度只有原病毒的 0.01%，但是却能够感染对原病毒不易感的鸡胚組織，并生成新的病毒顆粒。Mountain 和 Alexander^[72] 报告，用 300~4,000 个感染单位的脊髓灰白质炎 I 型病毒 RNA 接种 7~8 天的鸡胚，于感染数小时后，在羊膜、胚胎及羊水中均有病毒合成。但是新合成的病毒仍保留原病毒对鸡胚的不易感性(表 4)。

表 4 脊髓灰白质炎病毒 RNA 对鸡胚的感染性^[72]

鸡胚感染時間	悬 液 的 种 类	悬液产生空斑的能力	
		胚胎或羊膜	羊 水
30~38分	50%組織悬液或不稀羊水	0/6	0/5
2 时	”	0/7	0/7
4 时	”	6/11	1/8
6 时	”	11/12	6/12
8 时	”	12/15	4/9
18~24时	”	4/20	8/28
2 天	”	0/3	1/3
5~7 天	”	1/5	1/4

注：分母为試驗鸡胚数，分子为产生空斑鸡胚数。

Holland 等^[51, 52] 也观察到脊髓灰白质炎 I 型病毒 RNA 可感染原来不易感的多种細胞及动物。如兔纖維母細胞、L株小白鼠纖維母細胞、棉鼠表皮細胞、兔皮肤細胞、鸡、豚鼠、地鼠等的肝細胞、小白鼠、兔、豚鼠、小鸡、地鼠等动物的脑腔等。

在植物病毒方面 Gordon 和 Smith^[45] 也曾观察到一株烟草

花叶病毒 RNA 具有比原病毒較广的感染范围。

但是另一方面, Portocala 等^[77, 78] 观察到, 曾从一株在实验室中經鸡胚多次传代的甲型流感病毒提出感染性 RNA, 虽然可以感染鸡胚, 但感染后所合成的子代病毒感染力較原毒株为低, 同时子代病毒的血凝性质較接近于初从人分离的原毒株而与实验室中多次传代株差別較大。

Maassab^[66] 也分离得甲型流感病毒的感染性 RNA, 但这种核酸不能感染对流感病毒易感的鸡胚, 只能感染鸡腎細胞培养。感染后在鸡腎細胞上繁殖的病毒通过鸡胚羊膜腔传代后感染滴度仍很低, 只有 2.0 EID₅₀ (对数)/毫升左右, 在鸡腎細胞繁殖时则可达 5.3 对数。

Mayer 等^[71] 报告, 从 λ 噬菌体提取到的 DNA, 虽然可以感染大肠杆菌的原浆胞培养, 但是却不能感染完整的大肠杆菌。

我們观察到乙型脑炎 RNA 对鸡胚胎的感染力似乎比原毒株低。用相当大量 (6.5 LD₅₀ 对数, 以小白鼠脑內滴度为标准) 的 RNA 接种鸡胚时, 也不易引起 100% 的感染。

分析前一种情况, 病毒 RNA 有着較广的宿主感染范围是可以理解的, 因为 RNA 可能直接渗入細胞內引起感染, 而病毒顆粒則需先經病毒与細胞間的某种亲和作用例如某种細胞受体或特异性酶的作用后, 始能得到机会将其 RNA 注入細胞。对后一种情况, 可能假定: (1) 若干病毒 RNA 在提取时容易改变其性质, 或 (2) 它們需要某种特殊性輔助物质共同作用始能充分表现其感染性, 在提取时这些物质大部遭受損失 (关于这些問題已在上面对討論)。在适宜的細胞內, 可以供应一部分这种物质; 在另一些細胞內, 虽然也可能存在着类似的物质, 因此也可以引起一定程度的感染, 但是在这种情况下, 所合成的病毒可能是异常的, 如在 Maassab 的实验。如果第一种假定合乎实际情况, 病毒 RNA 完全决定病毒的遗传和变异的观点仍是巩固的, 如果是第二种假定, 便需要重新考虑这个問題。

当病毒 RNA 在宿主細胞內引起正常感染时, 所合成的病毒

的生物学性质基本上是和原病毒相似的。除了上述具有相同抗原性外, Brown 等^[18] 观察到口蹄疫病毒嗜神经株的 RNA 所合成的病毒仍为嗜神经性的。Papaevangelon 和 Youngner^[76] 报告从脊髓灰白质炎病毒的耐热株提出 RNA, 所合成的子代病毒仍是有耐热性的。

特别有趣的是 Gerber 和 Kirschstein^[40] 的试验。他们用 3 株具有不同温度特征的脊髓灰白质炎病毒进行试验。

第 1 株(Mahoney)——对猴子致病性很高;

第 2 株 L_{Sa}——对小白鼠有致病性;

第 3 株 L_{Sc}——对小白鼠无致病性, 对猴子致病性很低。

结果各株病毒的 RNA 及其合成的病毒在 36°C 和 40°C 条件下培养时的繁殖情况完全与其原来的毒株一致(表 5)。

表 5 不同脊髓灰白质炎病毒株及其 RNA 的“T”特征^[40]

病 毒 株	材 料	病毒在猴肾细胞培养的滴度 (log PFU/0.2毫升)	
		36°C	40°C
Mahoney	病 毒	7.25	7.22
	RNA	2.9	2.88
	RNA 经兔肾传代	3.7	3.14
L _{Sa}	病 毒	7.2	4.7
	RNA	2.8	1.3
	RNA 经兔肾传代	—	—
L _{Sc}	病 毒	7.0	<1.0
	RNA	3.17	0
	RNA 经兔肾传代	2.90	—

— 表示未试验。

根据上述材料, 一方面可以说病毒 RNA 含有遗传信息, 决定了毒株的遗传性, 但是它可能容易改变而引起病毒的变异。关于这一点, Gierer 和 Mundry^[42] 和 Boeyle^[11] 用亚硝酸处理 TMV 和脊髓灰白质炎病毒的 RNA, 获得了变异株, 足资证明。然而 Bawden^[10] 曾对这一问题提出了疑问——即亚硝酸处理所得到的

毒株可能是起淘汰作用而非引起变异。看来，Bawden 的看法仍是值得讨论的问题。此外也还未能完全排除病毒蛋白质在病毒遗传性和变异方面的作用。

(二) 不同毒株核酸结构的差异及其与蛋白质结构的关系

为了深入了解核酸与病毒遗传变异的关系，必须进一步了解不同毒株核酸的分子结构有何差异。Schaffer 等^[89]分析三个不同类型脊髓灰白质炎病毒的核碱成分，结果脊髓灰白质炎病毒 RNA 的核碱成分虽然与 TMV 及宿主细胞 RNA 有明显差异，但是三株相互间看不到有什么不同(表 6)。

表 6 不同脊髓灰白质炎毒株 RNA 的碱基组成^[89]

病毒及细胞材料	碱 基			
	G	A	U	C
Mahoney	0.99±0.04	1.14±0.02	1.00±0.03	0.87±0.02
MEF ₁	0.93±0.02	1.15±0.02	1.02±0.03	0.90±0.01
Saukett	0.98±0.02	1.12±0.02	1.05±0.03	0.87±0.01
三株平均	0.96±0.04	1.14±0.02	1.01±0.03	0.88±0.04
TMV	0.76±0.015	0.89±0.015	0.90±0.024	1.51±0.018
FL 细胞	1.28	0.86	0.68	1.18
HeLa 细胞浆	1.49	0.69	0.78	1.04

因此多数作者同意这种假设：同类型病毒 RNA 的核苷酸成分并无明显差异，只是由于这些核苷酸在 RNA 分子上排列位置的改变始产生株(也可能是型)的差别。但是目前要了解 RNA 大分子中各核苷酸的排列位置在技术上十分困难，因此有人想出一种间接的方法。根据目前对蛋白质合成的理论：RNA(或 DNA)分子中核苷酸的排列位置决定其相关蛋白质分子中各氨基酸在合成时的排列位置，一般认为，2~3 个核苷酸排列在一起通过直接吸引决定 1 个氨基酸的排列位置——密码假说或模板作用，那么一切病毒(或细胞)的 RNA(或 DNA)的结构与其相关的蛋白质分子中氨基酸的排列应有共通规律性。因此，比较地研究数种蛋白

质（例如病毒蛋白质）的结构差异便可以间接地推知其相对的 RNA 分子的结构。

Yčas^[103] 假定，在 RNA 核苷酸密码不重叠的情况下，任取二种病毒进行比较，第一种病毒蛋白质中氨基酸含量与第二种病毒氨基酸含量的差异如以克分子分数表示，便应当等于两种病毒颗粒中 RNA 所含核苷酸量的差异的克分子分数，即 $\Delta n / \Delta a = 1$ （式中 Δn 为核苷酸差异的克分子分数， Δa 为氨基酸差异的克分子分数），除非蛋白质分子中氨基酸的取代可决定于二组以上不同排列的核苷酸组（但在这种情况下核苷酸组便失去其作为密码的意义）。他分析 5 株植物病毒和一株脊髓灰白质炎病毒的 RNA 和蛋白质，结果看到在 SBM, TBS, CV, TMV, TYV 和 PV 6 株病毒中，如以 TYV 为标准，假定其 $\Delta n / \Delta a = 1$ ，便只有 PV 和 SBM 较接近于 1（前者为 1.09，后者为 0.95），其余的相差甚远。但是 TYV 的 RNA 中胞核苷酸含量比这二种病毒多，同时所含的异白氨酸、赖氨酸、苏氨酸和脯氨酸的量也较高。由此看来，单独由于胞核苷酸含量的差别即可影响至少 4 种氨基酸的取代，在理论上不易解释。因此尚未能证明核酸结构怎样决定蛋白质的结构，也未能借此了解核酸分子的排列情况。该作者认为病毒 RNA 本身可能不含有完整的遗传信息，其中的一部分可能决定于宿主方面。这种见解和上文对 Maassab 的流感 RNA 感染性实验的分析一致。但是必须指出，如果这种假设正确，对病毒的遗传起主导作用的仍在病毒 RNA 方面，而宿主起辅助作用，因为合成的新物质是属于病毒的物质。

Reddi^[81] 用牛胰酶和蛇毒二酯酶降解不同的 TMV 毒株 (TMV, HR, M 和 YA 株)，看到其低核苷酸的组分不同，当然还远未能反过来说明这些毒株的 RNA 分子结构或各核苷酸的排列次序与蛋白质结构有何关系。

Woody 等^[105] 分析若干用亚硝酸处理的 TMV 变株，看到其胰酶消化后多肽片段有些差异。Wittman^[104] 研究 26 株人工诱导的和自然存在的 TMV 变株的多肽和氨基酸组成，虽然其中若

于毒株的致病性存在着相当大的差别，但是其氨基酸組成沒有明显差异。分析二个野毒株的多肽組成則有一定差异，但是尚不能証明这种差异与其核苷酸結構有何直接关系。

Wittman 认为，可能在 RNA 分子上只有一小段（一般称为“核心”）起着密碼作用，必須改变此核心部分的核苷酸組成始能引起相应的蛋白质結構的改变。毫无疑问，不同毒株的核酸及其蛋白质的分子結構必有差异，但是目前还没有足够的資料足供說明病毒核酸結構的差异为直接决定蛋白质結構的唯一条件。此外，在研究病毒的核酸及蛋白质結構时，还須注意在病毒制剂中可能有混合株的存在。在这种情况下，必需先获得純株用以进行化学分析，始能确定蛋白质和核酸两者結構上的关系。

最近根据 Lengyel 等^[63] 和 Martin 等^[64]的报告，人工合成的多聚核苷酸对不同氨基酸的并合到蛋白质中似乎起着特异性作用。这些研究結果使蛋白质——核酸分子結構之間的相互关系的研究向前推进了一步，但是尚难用这种现象闡明病毒核酸与病毒蛋白质在生物合成过程中的相互关系，以及病毒核酸对病毒蛋白质結構的影响。这些問題，仍待进一步研究。

除了注意研究 4 个核苷酸的排列外，研究其他所謂次要核苷酸的存在可能有一定意义。Litman 和 Pardee^[65]用 5-溴尿嘧啶取代噬菌体的胸腺嘧啶曾获得高比例的变异株，但是当将新株繼續传代时，看到 5-溴尿嘧啶重新被胸嘧啶所取代，而仍保留新株的特性。是否在 5-溴尿嘧啶取代时，产生了异常合成，此时 DNA 分子获得或失去某种次要核苷酸，因此产生变异。

Mandel 和 Borek^[66]看到，当大肠杆菌在蛋氨酸缺乏时，所合成 RNA 的 4 个核苷酸在量及比例方面均不变，但是合成了一些甲基化核碱（如 2-甲基-腺苷等）。在病毒感染时細胞內是否也合成了一些次要核苷酸，尚有加以研究的必要。

总之，根据目前所得的資料至少可以认为感染性核酸为病毒遗传性变异性的主要物质。

四、病毒感染与宿主細胞內的核酸代謝

(一) 病毒感染对細胞核酸的含量和組成的影响 既然病毒核酸可以引起特异性感染, 研究病毒感染后細胞內核酸的代謝便将有助于解释病毒的繁殖机制, 并有利于說明有关核酸和蛋白质的生物合成机制等問題。

Ackermann 等^[1]报告, 用脊髓灰白质炎病毒感染 HeLa 細胞后 6 小时, 細胞內 RNA 总量增加了一倍半, 但其中各核苷酸的比例不变。用超速离心沉淀証明这些增加的 RNA 与病毒本身无关, 該作者认为这是由于感染后細胞不正常生长之故。

Ginsberg 和 Dixon^[43]报告, APC 病毒感染 HeLa 細胞后也使細胞內 RNA 总量增加了 25%, DNA 增加了 81 ~ 560%, 蛋白质增加了 58%。同样只有少量 DNA 是属于病毒顆粒內的。Green 和 Daesch^[46]对 APC 病毒的研究也看到同样情况。

另一方面, Salzman 等^[86]看到, 用脊髓灰白质炎病毒感染 HeLa 細胞后, 細胞內 RNA 和 DNA 的含量即停止增加, 在感染后 6 小时反而有所降低。此时細胞对胞核苷- C^{14} 的利用率降低。Rothstein 和 Manson^[84]也有类似报告, 他們观察到, 在脊髓灰白质炎病毒感染后, HeLa 細胞对 P^{32} 的利用率有明显降低。他們认为病毒感染可能抑制了細胞內核酸的正常合成, 受染細胞可能失去自己原来的活力。

但是 Martin 等^[69]报告, 脑心肌炎病毒在 Kreds II 株小鼠腹水瘤細胞內繁殖时虽不引起細胞內的 RNA, DNA 和蛋白质总含量的任何变化, 但在感染的前几小时內看到細胞对乳清酸- C^{14} 的利用率有明显增加, 同时細胞內的核苷酸庫减少。

在病毒感染后, 病毒核酸和蛋白质便迅速在細胞內进行合成。Hershey 和 Chase^[49]观察到噬菌体感染后細菌体内迅速合成了 5-羥甲基胞嘧啶。在别的病毒方面目前还不能証明細胞在受染后合成了什么异常的核苷酸。Rafelson^[79]报告如果将活的和热灭活的流感病毒接种鸡胚絨毛尿囊膜培养, 用酸提取 RNA,

这些接种病毒的和正常組織 RNA 含量并无明显差别,但是当用 ECTEOLA 纖維作柱层离时,观察到正常組織的和接种灭活病毒的組織 RNA 各部分光密度曲綫完全相同,用活病毒感染的組織在第 29 和 201 部分各有一高峰而正常的沒有,但正常的在第 66 和 116 部分有高峰而受染的沒有(图 4)。在各相同部分中 RNA 的核碱成分基本上相同。如在培养液中加入甘氨酸-1- C^{14} ,病毒感染的結果阻止同位素渗入到第 4 个高峰中。这个实验說明,受染細胞內 RNA 的总含量虽无明显改变,但是在 RNA 的組分方面与正常情况有所不同。这无疑是由于新病毒核酸合成的結果。

(二) 合成病毒核酸的基础材料 Evans 1954 年指出大肠杆菌噬菌体的 DNA 除了一小部分从細菌的 DNA 轉化以外,大部分直接从培养基合成。

Salzman 等^[36]报告,在脊髓灰白质炎病毒感染时,細胞原来的 RNA 受到破坏,但該作者(1961)又报告,如用尿核苷-2- C^{14} 和腺嘌呤-8- C^{14} 加到細胞培养中,于 4 小时后看到同位素分別并合到并轉化为細胞中 RNA 的尿嘧啶和腺嘌呤。如在加入同位素 4 小时后再感染以脊髓灰白质炎病毒,于感染后 6~9 小时看到細胞內酸溶性核苷酸庫的放射性比其 RNA 的高 3~6 倍,同时間內所合成的病毒 RNA 的比活性与核苷酸庫相似。該作者认为病毒 RNA 不可能从細胞 RNA 合成而是从核苷酸庫合成。Arnoff 和 Rafelson (1959) 用 1-氮杂絲氨酸抑制鸡胚絨毛尿囊膜培养对嘌呤的合成,然后感染流感病毒,結果并不影响病毒的繁殖,說明該病毒的繁殖与細胞核酸无关。

但是 Diamond 和 Ball^[24]报告,如果在脊髓灰白质炎病毒感染 HeLa 細胞前 2 小时在培养基中加入甘氨酸-1- C^{14} ,則病毒 RNA 的鳥嘌呤和腺嘌呤比活性高于对照。如感染后 2 小时加入同位素,則病毒 RNA 的鳥嘌呤比活性只有对照的 15%,而腺嘌呤为其对照的 55~75%。病毒对两种嘌呤需要量相同,因此,一部分鳥嘌呤系由宿主細胞所供应。該作者认为有可能直接从宿主細胞的 RNA 轉化。宿主 RNA 部分物质可能轉入酸溶性核苷酸庫。

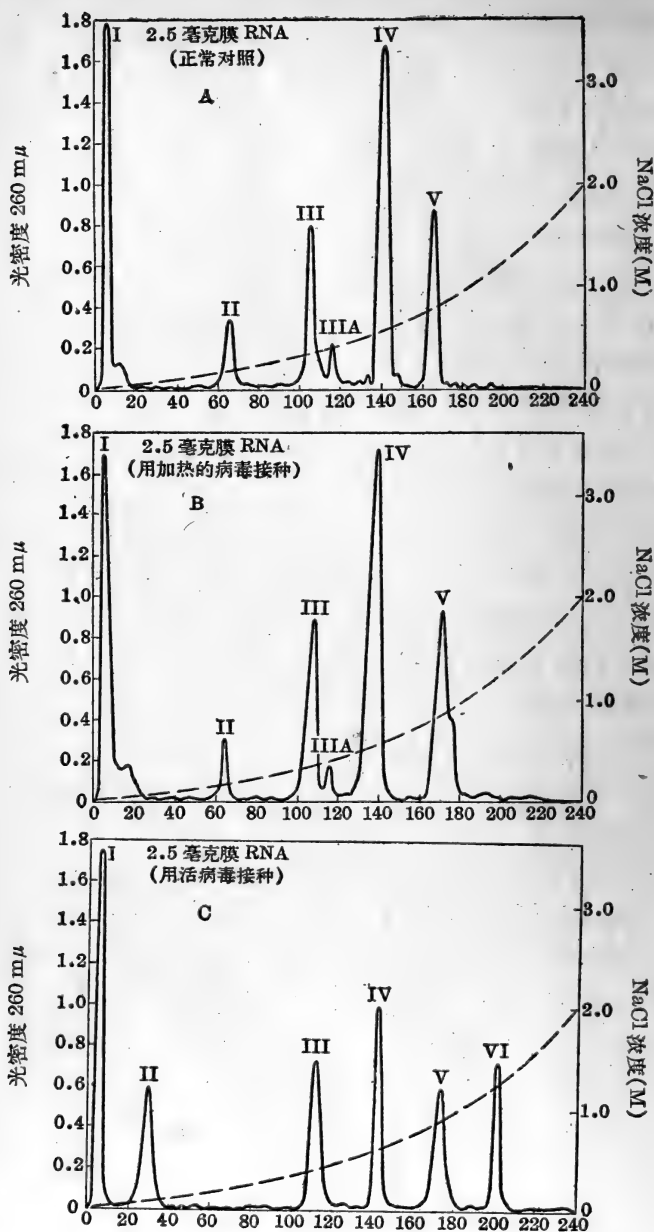


图 4 流感病毒感染对鸡胚绒毛尿囊膜 RNA^[79]

在含DNA的病毒方面也有与前述实验相类似的材料。Magee等^[67]用胸腺核苷- H^3 和牛痘病毒同时加到细胞培养中，细胞立即停止自身DNA的合成。同位素并合到病毒的DNA中在感染后6小时达到最高，如将同位素加到正常细胞，在8~13时后并合量始达到最高。从病毒DNA与细胞DNA对 H^3 利用速率看来，作者认为，病毒DNA不是从细胞DNA合成的。

在APC病毒方面，Green和Daesch^[46]报告受染细胞虽停止分裂，但是如果根据细胞数目计算蛋白质、DNA和RNA的含量，在受染细胞中这些物质的含量便都增加了，而DNA增加最早。该作者认为，这些增加的DNA与病毒繁殖有关。

Ginsberg和Dixon^[44]用蚁酸盐- C^{14} 和 P^{32} 和APC病毒同时接种HeLa细胞，观察到同位素并合到病毒DNA中的量比并合到细胞DNA中的量高得多。但是如果同位素在病毒感染前一些时候加入，则病毒DNA中同位素含量比前一种情况仅低10~20%。可见病毒DNA可以从先用同位素标志的细胞内的DNA前身合成，少部分从未标志的培养基中物质合成。

由此看来，病毒的核酸——DNA及RNA大部分可能从细胞中核酸前身——核苷酸库合成，较小部分直接从培养基合成。但是不同类型的病毒可能还有差别，是否可能有一部分从宿主细胞的核酸转化尚需加以探讨。

(三) 受染细胞内病毒核酸和蛋白质生物合成的相互关系

目前生物化学家在讨论到核酸及蛋白质的生物合成时，常以Watson-Crick^[101]所提出DNA双链的复制假说为依据，认为DNA可以由DNA双链通过一定的嘌呤-嘧啶核苷酸的相互吸引直接复制。其后观察到病毒RNA有感染性并能合成病毒颗粒，因此认为RNA本身也可以进行复制并复制蛋白质。因此DNA及RNA都带着遗传信息。

病毒的DNA或RNA可以引起感染的事实也支持这种学说；同时根据上面提到若干作者的报告，TMV和脊髓灰白质炎病毒等的感染性RNA的生成比完整病毒较早。看来RNA先进行

复制然后合成完整病毒的蛋白质。但 Darnell 和 Levington^[11] 用 L-纈氨酸- C^{14} 进行試驗，观察到同位素并合到脊髓灰白质炎病毒蛋白质的时刻是在病毒顆粒开始成熟的时候，即在感染后两个半小时。其后 Darnell 等^[12] 用腺核苷-8- C^{14} 进行試驗，观察到虽然同位素标志的病毒 RNA 的合成在完整病毒全部合成之前約 1 小时完成的，但是 RNA 和病毒蛋白质的合成几乎都同时开始，而蛋白质在头几小时内的合成速率較 RNA 快。該作者在討論中认为，根据每一个脊髓灰白质炎病毒蛋白质分子中包有 60 个亚基而只有一个 RNA 单位 (Finch 和 Klug^[11]; Horne 和 Nagington^[54]; Boeye^[11]) 的情况看来，如果这一个 RNA 分子要复制 60 个蛋白质分子，病毒蛋白质的合成便須經過一个相当长的迟緩期，这和两者差不多都在同時間开始合成的情况不相符合。另一方面，根据 Crick 和 Watson^[20] 計算，即使在結構較簡單的植物病毒，核苷酸和氨基酸的比例也很大，例如在 TMV，每 1 个氨基酸有 50 个核苷酸。很难解释这么多核苷酸的具体作用。

除此以外，有些报告說明，脊髓灰白质炎病毒蛋白质和病毒 RNA 可能在細胞內不同位置上合成。如 LeBrun (1957) 用螢光抗体証明，該病毒抗元物质在感染后 1 小时即出现于胞浆內，而根据 RNA 均在胞核內合成的见解 (Brachet^[12])，那么两者的合成位置不同，合成的時間又几乎同时开始，这样要解释病毒 RNA 对蛋白质合成的直接控制，尚有困难。另一困难解释的是，根据 Ledinko^[61, 62] 的报告，在 ploflavine 的作用下，受脊髓灰白质炎病毒感染的細胞可以繼續产生抗元物质，但是不能合成感染性 RNA。这些問題尚待进一步闡明。

Contreras 等^[13] 利用 P^{32} 进行試驗，观察到在脊髓灰白质炎病毒感染細胞后同位素立即 (在零时) 大量并合到蛋白质中 (在零时已达对照的 206%，在 30 分钟时达 116%)，而在感染后 30 分钟时始大量并合到 RNA 中 (在 0 时达对照的 110%，在 30 分钟时达对照的 232%) (表 7)。該作者分离受染細胞的蛋白质得到溶于酸、氯仿和甲醇的磷脂多肽及不溶性的磷酰二种物质。前者在零时的量

表7 脊髓灰白质炎病毒感染对 P^{32} 并合到细胞蛋白质
及 RNA 的影响^[19]

物质种类	实验次数	感染时间	比活性(%)试验/对照	机 率
蛋 白 质	5	0分	206±41	P<0.02
	2	30	116	
	5	60	117±9	
	5	120	106±10	
RNA	7	0	110±18	P<0.02
	3	30	232	
	7	60	140±17	
	6	120	109±7	

比对照高 10 倍但是比活性很低,后者虽然只增加 2~3 倍,但是含有很高的比活性。这些作者(1961)继续观察到磷酰的合成在受脊髓灰白质炎病毒感染的细胞内很明显地先于 RNA, 同时如用氯霉素抑制这种蛋白质的合成,其结果也抑制了病毒 RNA 的合成。该作者认为磷酰可能为合成 RNA 的前驱物质,这或者是由于它含有高能量或者为一种与合成 RNA 有关的酶。

Wecker 和 Schonne^[103]报告,即使在病毒 RNA 已开始合成以后加入对位氟苯代丙氨酸也可抑制西方马脑炎病毒 RNA 的合成。利用对苯代丙氨酸- C^{14} 进行试验,观察到这种物质自身可并合到蛋白质中,而影响了苯代丙氨酸的正常结合,因此间接影响了 RNA 的合成。

在噬菌体方面,Burton^[17]和 Hershey 和 Melechen^[50]观察到,受染细菌体内某些蛋白质的生成为合成噬菌体 DNA 所需,然不赖以继续。因为如在噬菌体感染后 10 分钟时始加入氯霉素以抑制蛋白质的继续合成, DNA 的合成仍可进行 (Tomizawa 和 Simakawa^[100])。Flaks 等^[32]和 Zimmerman 等^[103]证明大肠杆菌噬菌体的合成依赖菌体内羧甲基脱氧胞核苷酸酶的首先合成。

当然,病毒核酸感染如何引起这些与核酸合成有关的蛋白质

或酶的生成,其机制尚难阐明。

可能在病毒核酸(RNA 或 DNA)的激发和作用下,催化了一系列合成病毒核酸和病毒蛋白质所需的酶的合成(此时看到一些蛋白质或核蛋白质开始合成),在后者的作用下,才开始病毒核酸和病毒蛋白质的合成。在这个过程中,病毒核酸仍起主导作用,不但在于它激发反应,同时在于它传递遗传性质,合成了特异性的蛋白质和核酸自身(在这方面 Stent^[95] 也认为遗传信息先传递给原来不敏感的蛋白质或核蛋白质,然后这些蛋白质成为合成新蛋白质或核酸的模板)。在一定时间后,这些合成的物质相结合而成完整的病毒颗粒——在此以前感染性核酸可能游离存在,合成完整病毒以后,多余的感染性核酸也可能游离存在或与一部分病毒蛋白结合为不完整的结构。但是关于这些假设的可能性,还需要做更多的实验来证实。

至于 DNA 和 RNA 相互间在合成过程中所起的作用如何尚需讨论。一般认为 DNA 控制遗传信息并控制 RNA 的合成。但是在病毒方面的研究,Simon^[92] 用氨基蝶呤(aminopterin)和 5-氟尿嘧啶抑制 HeLa 细胞内 DNA 的合成,结果并未影响脊髓灰白质炎病毒(含 RNA 的病毒)在 HeLa 细胞内的正常繁殖。因此可以认为至少不是所有的病毒 RNA 的合成均与 DNA 有密切关系。

另一方面,Tamm 等^[97] 报告,5,6-二氯-1-B-D-核糖伍图糖邻苯并咪唑(5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosyl benzinidazole)可抑制鸡胚绒毛尿囊膜将腺核苷-8- C^{14} 并合到 RNA 中及抑制将 L-甘氨酸- C^{14} 并合到蛋白质中,在这种情况下对脊髓灰白质炎病毒的繁殖则影响不太,但是即使用较低浓度的上述药剂也能大大抑制牛痘病毒(含 DNA 病毒)在上述组织中的繁殖。并且 RNase 也能抑制牛痘及单纯疱疹病毒(亦为 DNA 病毒)在这些组织中的繁殖。

Kaplan 和 Ben-Porat^[57] 观察到 5-氟尿嘧啶可并合到正常猴肾细胞中的 RNA 分子上,同时抑制了细胞对 DNA 的正常合成功能。但是如果再用假性狂犬病毒感染细胞,由于病毒 RNA

的合成,使 DNA 的合成也重新恢复。由此可能得到另一假說:根据病毒的繁殖看来 RNA 为 DNA 的合成与 RNA 有密切关系。虽然如此,关于 DNA 与 RNA 生物合成的相互关系,尚需进一步研究,目前还难下任何結論。

在总结这一篇文章的时候仍然应该着重指出,虽然感染性核酸无疑是病毒感染性、遗传性和变异性的主要化学基础,但是尚难說是唯一的,它是否需要别的物质的輔助来完成它的作用这种可能性尚未能除外。至于談到病毒核酸与病毒蛋白质生物合成的相互間关系問題,目前还了解得不够。

参 考 文 献

- [1] Ackermann, W. W., Loh, P. C. & Payne, F. F., *Virology*, 7:170, 1959.
- [2] Ada, G. L. & Perry, B. T., *J. Gen. Microbiol.*, 19:40, 1958.
- [3] Ada, G. L. & Anderson, S. G., *Nature*, 183:799, 1959.
- [4] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M. & Van Damme, O., *J. Exp. Med.*, 108:493, 1958.
- [5] Anderson, S. G. & Ada, G. L., *Aust. J. Exp. Biol. Med Sci.*, 37:353, 1959.
- [6] Arnoff, H. & Rafelson, M. E. Jr., *Arch. Biochem. Biophys.*, 81:421, 1959.
- [7] Bachrach, H. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1:289, 1959.
- [8] Bachrach, H. L., *Virology*, 12:258, 1960.
- [9] Bachrach, H. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 107:610, 1961.
- [10] Bawden, F. C., *Nature*, 184:BA 27, 1959.
- [11] Boyle, A., *Virology*, 9:691, 1959.
- [12] Brachet, J., *Biochemical Cytology*, Academic Press INC., N. Y., 1957.
- [13] Brown, F., Sellers, R. F. & Stewart, D. L., *Nature*, 182:535, 1958.
- [14] Brown, F. & Stewart, D. L., *Nature*, 184:BA 74, 1959.
- [15] Brown, F. & Stewart, D. L., *Virology*, 7:408, 1959.
- [16] Brown, F. & Stewart, D. L., *J. Gen. Microbiol.*, 23:369, 1960.
- [17] Burton, K., *Biochem. J.*, 61:473, 1955.
- [18] Colter, J. S., Bird, H. H., Mayer, A. W. & Brown, R. A., *Virology*, 4:522, 1957.
- [19] Contreras, G., Toha, J. & Ohlbaum, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 35:268, 1959.

- [20] Crick, F. H. C. & Watson, J. D., CIBA Foundation Symposium on the Nature of Viruses, J. 4A. Churchill LTD. London, p 5, 1957.
- [21] Darnell, J. E. Jr. & Levintow, L., J. Biochem., **235**:74, 1960.
- [22] Darnell, J. E. Jr., Levintow, L., Thoren, M. M. & Hooper, J. L., Virology, **13**:271, 1961.
- [23] De Somer, P., Prinzie, A. & Schonke, E., Nature, **184**:652, 1959.
- [24] Diamond, L. & Balls, M. F., Virology, **15**:210, 1961.
- [25] Drayton, H. A., Nature, **192**:896, 1961.
- [26] Dubes, G. R. & Klinger, E. A. Jr., Sci., **133**:99, 1961.
- [27] Ellem, K. A. O. & Colter, J. S., Virology, **11**:434, 1960.
- [28] Ellem, K. A. O. & Colter, J. S., Virology, **12**:511, 1960.
- [29] Ellem, K. A. O. & Colter, J. S., Virology, **15**:113, 1961.
- [30] Engler, R. & Schramm, G., Nature, **183**:1277, 1959.
- [31] Finch, J. T. & Klug, A., Nature, **183**:1709, 1959.
- [32] Flaks, J. G., Lichtenstein, J. & Cohen, S. S., J. Biol. Chem., **234**:1507, 1959.
- [33] Fraenkel-Conrat, H., J. Am. Chem. Soc., **78**:802, 1956.
- [34] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B., & Tsugita, A., Virology, **14**:54, 1961.
- [35] Franklin, R. M. & Wecker, E., Nature, **184**:343, 1959.
- [36] Franklin, R. M., Wecker, E. & Henry, C., Virology, **7**:220, 1959.
- [37] Fraser, D., Mahler, H. R., Shug, A. L. & Thomas, C. A. Jr., Proc. N. Y. Acad. Sci., **43**:939, 1957.
- [38] French, R. C., J. Bact., **67**:45, 1954.
- [39] Gerber, P., Virology, **16**:96, 1962.
- [40] Gerber, R. & Kirschstein, R., J. Exp. Med., **111**:525, 1960.
- [41] Gierer, A. & Schramm, G., Nature, **177**:702, 1956.
- [42] Gierer, A. & Mundry, K. W., Nature, **182**:1475, 1958.
- [43] Ginsberg, H. S. & Dixon, M. K., J. Exp. Med., **109**:407, 1959.
- [44] Ginsberg, H. S. & Dixon, M. K., J. Exp. Med., **113**:283, 1961.
- [45] Gordon, M. P. & Smith, C., J. Biol. Chem., **235**:PC 28, 1961.
- [46] Green, M. & Daesch, G. E., Virology, **13**:169, 1961.
- [47] Hansen, V. P. & Schafer, W., Z. Naturforsch., **16 b**:72, 1961.
- [48] Herriot, R. M., Connolly, J. H. & Gupta, S., Nature, **189**:817, 1961.
- [49] Hershey, A. D. & Chase, M., J. Gen. Physiol., **36**:39, 1952.
- [50] Hershey, A. D. & Melechen, N. E., Virology, **3**:207, 1957.
- [51] Holland, J. J., McLaren, L. C. & Syverton, J. T., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **100**:843, 1959.
- [52] Holland, J. J., McLaren, L. C. & Syverton, J. T., J. Exp. Med., **110**:65, 1959.

- [53] Holland, J. J., Hoyer, B. H., McLaren, L. C. & Syverton, J. T., J. Exp. Med., **112**:821, 841, 1960.
- [54] Horne, P. W. & Nagington, J., J. Mol. Biol., **1**:333, 1959.
- [55] Huppert, J. & Sanders, F. K., Nature, **182**:515, 1958.
- [56] Kaper, J. M. & Steer, R. L., Virology, **7**:127, 1959.
- [57] Kaplan, A. S. & Ben-Porat, T., Virology, **13**:78, 1961.
- [58] Klingler, E. Jr. & Chapin, M., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **101**: 829, 1959.
- [59] Koch, G., Koenig, S. & Alexander, H. E., Virology, **10**:329, 1960.
- [60] LeBrun, J., Ann. inst. Pasteur, **93**:225, 1957.
- [61] Ledinko, N., Virology, **6**:512, 1958.
- [62] Ledinko, N., Virology, **8**:536, 1959.
- [63] Lengyel, P., Speyer, J. F. & Ochoa, S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **47**:1936, 1961.
- [64] Lippincott, J. A., Virology, **13**:348, 1961.
- [65] Litman, R. M. & Pardee, A. B., Nature, **178**:529, 1956.
- [66] Maassab, H. F., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **45**:877, 1959.
- [67] Magee, W. E., Sheek, M. R. & Burrous, M. T., Virology, **11**:296, 1960.
- [68] Mandel, L. R. & Borek, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., **4**:14, 1961.
- [69] Martin, E. M., Malec, J., Sved, S. & Work, T. S., Biochem. J., **80**:585, 1961.
- [70] Martin, R. G., Matthaei, J. H., Jones, O. W. & Nirenberg, M. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., **6**:410, 1962.
- [71] Mayer, F., Mackal, R. P., Tao, M. & Evans, E. A. Jr., J. Biol. Chem., **236**:1141, 1961.
- [72] Mountain, I. M. & Alexander, H. E., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **101**:527, 1959.
- [73] Nakamura, M., J. Immunol., **87**:530, 1961.
- [74] Nakamura, M., Nature, **191**:624, 1961.
- [75] Norman, A. & Veomett, R. C., Virology, **14**:497, 1961.
- [76] Papaevangelon, G. H. & Youngner, J. S., Virology, **15**:509, 1961.
- [77] Portocala, R., Boern, V. & Samuel, L., Acta Virologica, **3**:172, 1959.
- [78] Portocala, R., Boern, V. & Samnel, L., C. rend Acad. Sci., **249**:848, 1959.
- [79] Rafelson, M. E. Jr., Arch. Biochem. Biophys., **90**:68, 1960.
- [80] Rappaport, I., Nature, **184**:1732, 1959.
- [81] Redde, K. K., Biochim. Biophys. Acta, **32**:386, 1959.
- [82] Reichmann, M. E. & Stace-Smith, R., Virology, **9**:710, 1959.

- [83] Richter, A. & Clark, R. S., *Fed. Proc.*, **20**:444, 1961.
- [84] Rothstein, E. L. & Manson, L. A., *Virology*, **9**:141, 1959.
- [85] Salzman, N. P., *Virology*, **10**:180, 1960.
- [86] Salzman, N. P., Lockart, R. E. Jr. & Sebring, E. D., *Virology*, **9**:244, 1959.
- [87] Sanders, F. K., *Nature*, **185**:802, 1960.
- [88] Santilli, V., Piacitelli, J. & Wu, J. H., *Virology*, **14**:109, 1960.
- [89] Schaffer, F. L., Moore, H. F. & Schwerdt, C. E., *Virology*, **10**:530, 1960.
- [90] Schottisek, V. C. & Roth, R., *Z. Naturforsch.*, **16 b**:109, 1961.
- [91] Schramm, G. & Engler, R., *Nature*, **181**:916, 1958.
- [92] Simon, E. H., *Virology*, **13**:105, 1961.
- [93] Sprunt, K., Koenig, S. & Alexander, H. E., *Virology*, **13**:135, 1961.
- [94] Sprunt, K., Redman, W. M., Koenig, S. & Alexander, H. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **103**:306, 1960.
- [95] Stent, G. S., *Adv. Virus Res.*, **5**:95, 1958.
- [96] Tamm, I., Folkers, K., Shunk, C. H. & Horsfall, F. L., *J. Exp. Med.*, **99**:227, 1954.
- [97] Tamm, I., Nemas, M. M. & Osterhout, S., *J. Exp. Med.*, **111**:339, 1960.
- [98] Timasheff, S. W., Brown, R. A., Colter, J. S. & Davies, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **27**:662, 1958.
- [99] Toha, J., Contreras, G. & Ohlbaum, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **47**:158, 1961.
- [100] Tomizawa, J. I. & Simakawa, S., *J. Gen. Physiol.*, **39**:553, 1956.
- [101] Watson, J. D. & Crick, F. H. C., *Nature*, **171**:964, 1953.
- [102] Wecker, E., *Virology*, **7**:241, 1959.
- [103] Wecker, E. & Schonne, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**:278, 1961.
- [104] Wittman, H. G., *Virology*, **12**:609, 613, 1960.
- [105] Woody, B. R. & Knight, C. A., *Virology*, **9**:359, 1959.
- [106] Yëas, M., *Nature*, **188**:209, 1960.
- [107] Zachan, H. G., Acs, G. & Lipman, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **44**:885, 1958.
- [108] Zimmerman, S. B., Kornberg, S. R., Josse, J. & Kornber, A., *Fed. Proc.*, **18**:359, 1959.

第十讲 核酸对細胞分化的作用

薛 社 普

中国医学科学院实验医学研究所实验形态系

一、引 言

核酸的生物学作用目前已成为生物学和生物化学领域中引人注意的中心問題之一。其中 RNA 对蛋白质合成和 DNA 对于遗传所起的作用已累积了大量的資料証据。RNA 与蛋白质合成之間的关系在二十年前首先由 Caspersson^[22, 23] 及 Brachet^[8, 13] 分別用細胞化学和組織化学方法予以証实。他們的实验結果表明凡是生长或分化旺盛的組織（如胚胎細胞、肿瘤及增殖迅速的細菌）和分泌活跃的細胞（如胰腺的外分泌細胞、胃粘膜的胃蛋白酶分泌細胞、蚕的絲腺分泌細胞和唾腺細胞等）都有高度的蛋白质合成过程，在它們的細胞质和核仁中含有大量 RNA。在量的測定上，細菌在繁殖过程中迅速合成蛋白质，而其 RNA 含量相应增高^[95]。細菌的生长率与其 RNA 的平均含量成正比^[20]。葡萄球菌在加入核酸前体物（嘌呤或嘧啶）于培养基后，RNA 及蛋白质的合成均大增。缺氨基酸則二者合成均停止。如 RNA 含量降至 4%，蛋白质合成即完全被抑止^[37]。用 RNase 可以抑制氨基酸并合入胚胎細胞质的核蛋白中，其組合率可减少 85%^[2]。經 RNase 处理的变形虫停止增殖，加入 RNA 后又能使之回复^[15, 16]。

核酸的生物学作用同样表现在病毒和噬菌体核酸的感染性上。从 TMV^[99]，MEV^[21]，EEV^[80, 100] 和脊髓灰质炎病毒^[1] 提純的 RNA 均已証明具有感染性。T 型噬菌体 DNA 感染大肠杆菌后在細胞內的核酸合成状态目前也已广泛被研究而且得到証

实^[29, 97]。

至于 RNA 在蛋白质合成机制上起什么作用，这问题目前还未完全明了。Zamecnik 等^[29, 46, 111]一系列工作表明细胞内蛋白质合成和核糖微粒(ribosome)及微粒体(microsome)有密切关系，有二种 RNA 参与蛋白质的合成。其中可溶性 RNA(s-RNA)的多核苷分子作为适应者(adaptor)将自由氨基酸转运至核糖核蛋白颗粒(核糖微粒)的适当位置上，RNA 四个碱基的直线排列顺序以“密码”型式起模板作用，控制氨基酸的排列顺序，决定以后所合成的蛋白质的类型。这一“适应者”假说(adaptor hypothesis)虽然最初多半出于臆想，但最近 Ochoa^[74] 及 Nirenberg^[66] 等在他们“密码”假说中已提供了不少可贵的实验证据，说明信息 RNA 的碱基密码和 s-RNA 适应者对于组合氨基酸上的微妙关系。

核酸的生物学作用及其在遗传和蛋白质合成上的机制在近年来取得了很大的进展。细胞的分裂和分化机制的研究，目前的焦点之一也集中在核酸的作用问题上。本文只限于讨论核酸(RNA)对细胞分化特别是对胚胎细胞分化的作用。将要提到胚胎诱导作用与核酸的关系，外源 RNA 对改变胚胎细胞内物质代谢和导向新的分化的可能性的一些新近资料。

二、胚胎分化过程中核酸与蛋白质的合成状态

(一) 核酸及蛋白质合成与胚胎形态形成的关系 胚胎形态形成过程中的核酸及蛋白质合成状态近年来用细胞化学(包括生化分析)、组织化学、同位素标记和免疫血清学等方法，在海胆、昆虫、鱼类、两栖类、鸟类和哺乳类已经累积了大量研究资料。从这些资料可以总结出三条规律：(1)核酸和蛋白质的合成开始期、分布地区和在以后发育期中的变化，和胚胎细胞开始分化以及器官组织以后的分化时间和地区是一致的；(2)胚胎形态形成过程中相继出现的 A-V 轴(动物-植物极性轴)、D-V 轴(背腹轴)、A-P 轴(前后轴或头尾轴)和在同时期所测出的 RNA 轴性分布状态一

致,即 RNA 的 A-V 軸、D-V 軸和 A-P 軸的出現時間、順序和地區完全和形態形成的極性軸吻合; (3) 胚胎形態形成中心的脊索中胚層(chordomesoderm)在誘導過程中核酸及蛋白質代謝高度增強。部分資料在我們前一綜述中已有述及^[118]。這些規律表現在兩栖類最為明顯。Brachet^[7, 13] 發現受精的 *xenopus* 卵已見有微弱的 RNA 動植物極性軸出現。到原腸早期出現背腹軸, RNA 從背方向腹方遞減。在原腸後期和早神經軸胚期又出現頭尾軸性分布。其背腹軸此時更為明顯,背唇比腹唇更強,而特別在內卷的脊索中胚層和預定神經外胚層的細胞中含量最多(圖版一,圖 1~4)。雞胚在原條區^[13, 88] 和預定神經上皮的細胞中也同樣含有較多的 RNA,特別在脊索中胚層細胞和神經上皮細胞之交界面區核酸組織化學反應最為強烈(圖版一,圖 5)^[58]。Emanuelsson^[32] 用生化分析法也得到同樣結論,他還發現 RNA 在原腸期增高而 DNA 下降,認為 RNA 增高表示細胞進行分化,而 DNA 在早期時的高潮表明細胞分裂旺盛。魚類^[8]、爬蟲類^[96] 和哺乳類^[26] 的組織化學觀察指出在原條期的中胚層和預定神經外胚層的 RNA 最為顯著,也同樣出現了 RNA 的上述分布軸性。

RNA 軸性分布和形態形成極性軸的一致是否可以認為前者是後者的物質基礎? 困難是除 RNA 軸外,別的物质如 -SH 基及鹼性磷酸酶,生理試驗如 O_2 消耗、呼吸窗、還原及對毒物的反應(損傷、潰退、壞死)也有同樣一致的軸性分布或軸級性(gradient),而這些軸性似乎和細胞內顆粒(綫粒體、微粒體等)都有關連^[6, 17]。因此可以說上述這些物质的生物化學軸級性和形態形成軸可能都是這些細胞內顆粒的功能作用決定的。而 RNA 軸性分布和這些顆粒之間的直接關係是不矛盾的。如果 RNA 軸性分布和形態形成軸級性不是偶合的話,那麼抑制 RNA 或擾亂其軸性分布將會引起形態形成上的改變,而事實也是如此。Brachet^[7, 10] 曾用噻吩和嘧啶的化學結構類似物如苯駢咪唑(benzimidazole)、巴比妥酸、吡啶黃(acriflavine)等處理兩栖類胚胎以抑制 RNA 的合成, Bieber^[5], 和 Liedke 等^[60~62] 也分別用多種(後者用 100 種以上)

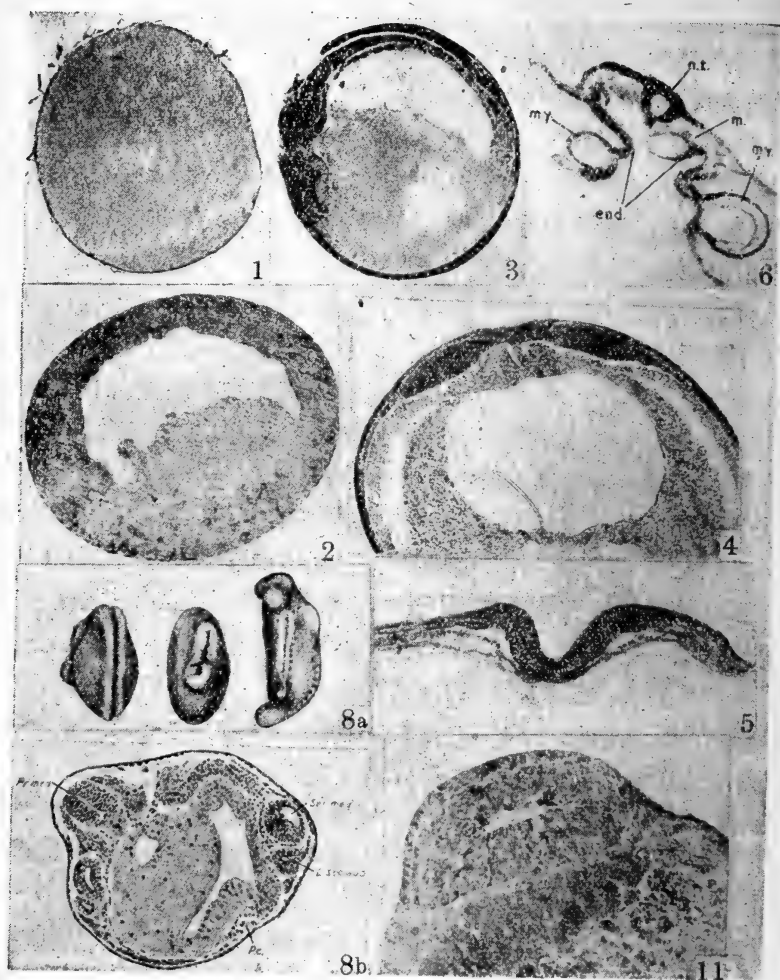


图 版 一

图1~4 两栖类(xenopus)早期胚胎 RNA 的轴级性分布。甲綠-嘔啉法^[18]。

图1 示xenopus 受精卵 RNA 微弱的动-植物极轴性分布。

图2 囊胚期, RNA 动-植物极轴性分布明显。

图3 晚原肠胚, RNA 呈背腹轴级性分布。

图4 早神经轴胚, RNA 的组织化学反应在神经外胚层和脊索中胚层较腹部各区为深。

嘌呤或嘧啶化学类似物作同样处理,结果均抑制了胚胎的发育,而且多半在原肠期受影响最大。在鸡胚方面,Waddington 等^[99]用 8-偶氮鳥嘌呤和苯駢咪唑处理后引起畸形发育,敏感区(原条及神经上皮)并合 S^{35} 蛋氨酸的过程大受抑制。他如锂离子^[33]、二硝基酚^[14]和酸、碱、热^[7, 12, 13]处理也有同样作用。离心处理扰乱 RNA 轴性后引起畸形或导致发育停止^[76]。

在蛋白质的轴性分布上,Eakin^[81] 和 Ceas^[24] 曾用同位素放射自显术观察到 S^{35} -蛋氨酸并合入两栖类胚背半较腹半为高。Sirlin^[81] 也得到背唇区并合率最高的结果。Rulon^[79] 在鸡胚显示 -SH 基在 7-9 体节期开始出现前后轴性分布。另一作者并指出原条及原结区特强^[55]。放射自显术也证明鸡胚的背部中轴结构如神经管、神经嵴、脊索等并合 S^{35} -蛋氨酸最多(图版一,图 6)^[75]。用嘌呤或嘧啶化学类似物也能抑制蛋白质的合成。-SH 抑制物(如 iodacetamide, chloropierine 和氧化型的谷胱甘肽)或含 -SH 物质(如 β -巯基乙醇)处理胚胎后由于抑制或改变了蛋白质的合成而引起畸形发育^[18]。最近曾弥白^[112] 曾用氨基酸类似物(乙基硫氨酸)处理离体东方蝾螈外胚层,发现有抑制神经组织分化的作用。上述资料表明蛋白质合成不但有轴性分布,而且在受到抑制时也引起异常发育。

(二) 变态过程(器官组织分化阶段)中核酸与蛋白质的代谢
无尾两栖类变态期的特点是器官组织进行成形分化而尾则退化消

图 5 鸡胚切经原条切面,示神经外胚层特别是与脊索中胚层的交接面区有较强的 RNA 反应。甲绿-吡啶啉法^[58]。

图 6 鸡胚(早体节期)横切面射线自显图,示神经管、嵴及脊索等区并合 S^{35} -蛋氨酸最多(黑色)^[75]。n. t. 脊索; m. 中胚层; my. 生肌节; end. 内胚层。

图 8a, b 组织诱导作用的原始试验。8a 示宿主胚胎被诱导出的第二神经板; 8b 宿主胚的横切面,注意具有二个躯体中轴(神经管、脊索和体节等)。L. Sec. aud. 诱导的耳囊; Pc. 围心腔; Pr. Med. 宿主神经管; Sec. Med. 诱导的神经管^[83, 84]。

图 11 蝾螈原肠胚切面,囊胚腔内植入烟草花叶病毒所诱导出的大神经管^[18]。

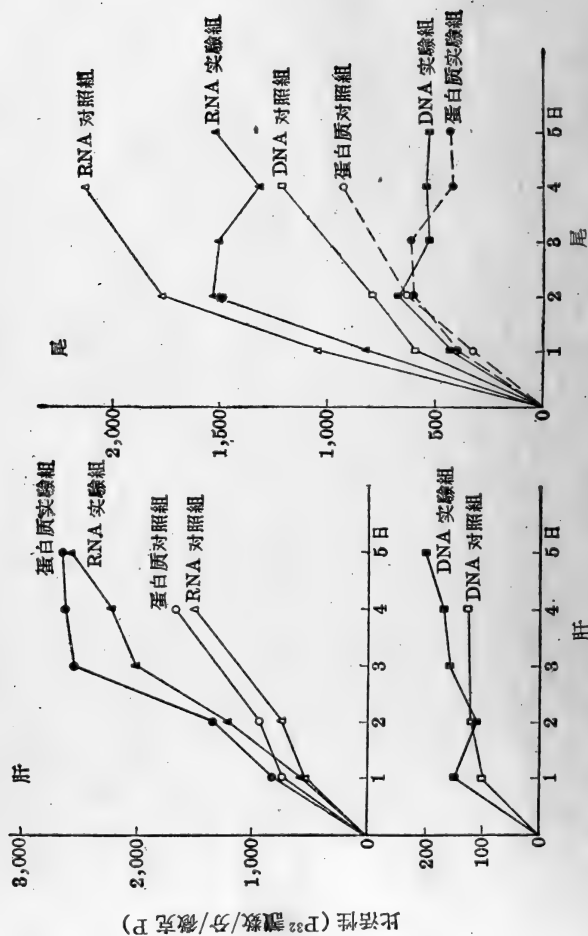


图 7 蝌蚪诱变态期中肝和尾 RNA、DNA 及蛋白质的 P^{32} 比活性比较

表1 蝌蚪誘发变态期中肝和尾RNA的单核苷酸的 P^{32}
比活性比較^[84]

单 核 苷 酸		对 照 組 肝 (日)			实驗(三碘甲状腺素处理) 組肝(日)		
		1	2	3	1	2	3
肝	胞嘧啶核苷酸	493	822	2170	665	2980	2910
	腺嘌呤核苷酸	743	1132	2300	877	3200	3520
	尿嘧啶核苷酸	623	845	1865	750	3010	3570
	鳥便嘌呤核苷酸	530	838	1755	680	2816	3340
	平 均	597	909	2023	743	3001	3350
尾	胞嘧啶核苷酸	1115	2085	2510	1362	——	——
	腺嘌呤核苷酸	——	2780	——	1141	2660	2200
	尿嘧啶核苷酸	1445	2210	2730	1165	2065	1900
	鳥便嘌呤核苷酸	1180	2030	2610	1192	2285	2430
	平 均	1246	2228	2616	1225	2227	2177

失。在这一关键的分化期核酸起什么作用？它的代謝活动有什么特点？也是一个引人注意的問題。

Finamore^[84] 以 *Rana grylio* 的蝌蚪为材料，以誘发变态物质(3, 5, 3-triiodo-L-tyrosine) 从腹腔注射蝌蚪(每克体重注射 $1 \times 10^{-8}M$)，1~2 小时后再注射 100 微居里 P^{32} ，于不同时期分别取肝和尾提取核酸进行分析比較。发现注射三碘甲状腺激素后，在变态的形态特征出现之前，肝 RNA、DNA 及蛋白质的 P^{32} 比活性較之对照組显著增高(并合率增高)，而尾則只在最初二日有上升，以后停止于一定水平上(图7)。对照組尾不退縮，其 RNA、DNA 及蛋白质則繼續上升。故尾的 RNA 及蛋白质比活性較对照組为低。实驗組肝中核酸的增高主要是由于 RNA 的增多。这种增高与变态期肝的体积增大(每肝的平均重量約增加 20%) 有关。用色层柱分析肝中单核苷酸 P^{32} 的比活性也得到同样結果(表1)。可见肝在变态期中組織分化过程与 RNA 及蛋白质的升高和尾在退消时的降低是平行而互为因果的。說明 RNA 在器官及組織分化期与在胚胎形态形成期一样起着重要的作用。Finamore^[85] 提

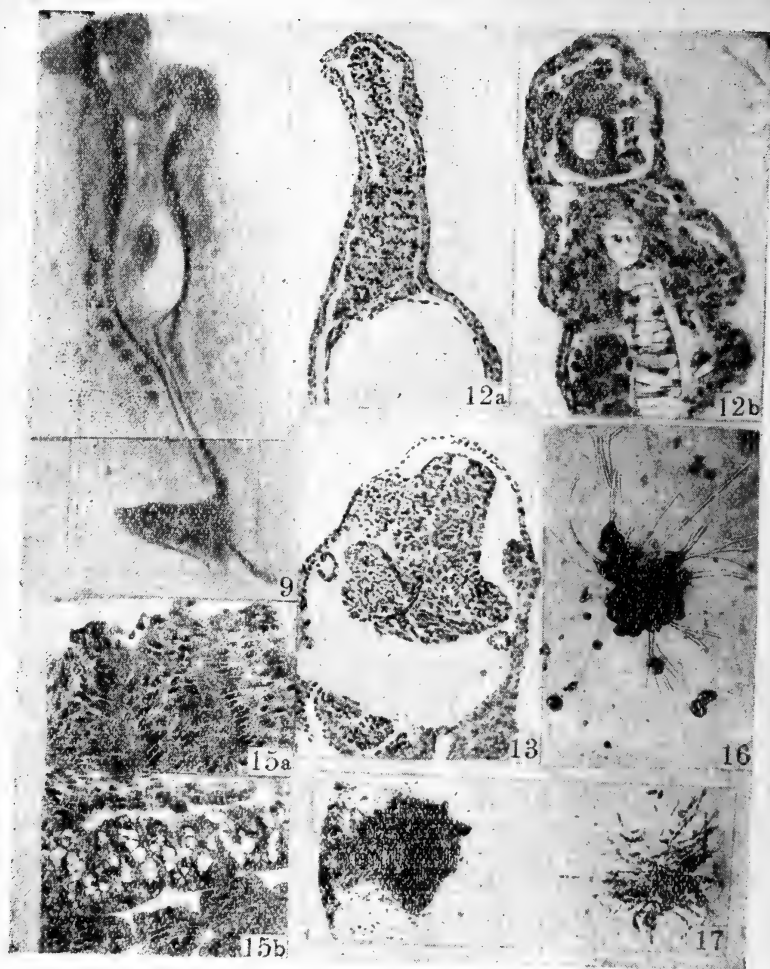


图 版 二

图 9 鸡胚原条期原结小块植入同期胚盘右侧外胚层下所诱导出的第二胚胎(右侧),注意后端突出的尾芽,手术后一天(薛社普未发表资料)。

图 12a, b 从豚鼠肾脏提取的核蛋白(PNP)对离体蝾螈(*Triturus pyrrhogaster*)外胚层小块的中后脑及躯干尾诱导作用。

12a 诱导出的躯干切面^[102]。

12b 诱导出的后脑及躯干部切面,具有耳囊、脊索和体节等结构^[104]。

图 13 从豚鼠肝脏提取的核蛋白对离体蝾螈外胚层小块的前脑区域诱导作用。切面示诱导出的前脑、眼囊、水晶体、嗅板等结构(Hayashi, 1956)。

出“核酸是发育的代謝鎖钥”不无道理。

三、胚胎誘导物的化学性质和核酸的胚內誘导作用

(一) 組織者 (Organizer) 的命名及其化学性质 在胚胎細胞分化的研究工作中最成功的是誘导分化。通过誘导組織或誘导物质的誘导作用使外胚层細胞向神經上皮方向分化。这种具有誘导作用的組織称为組織者(活組織)或誘导者。

組織者是 Spermann 和 Mangold^[83, 84] 发现的。他們把蝶螈的原口背唇割下移植至同期(原肠早期)同种或异种的腹外胚层(預定表皮)区或放入囊胚腔內, 結果背唇小块本身內卷进去自我分化成为脊索、体节和原肾等胚体背部的中軸組織, 并誘导与其相邻的外胚层細胞成为神經管(图版一, 图 8a, b)。以后該区整个成为一个比例协调、有头尾軸及左右对称的第二中軸系統(第二胚胎)。鸡胚原結也同样有組織者的作用(图版二, 图 9)^[40, 98, 114], 而且具有区域誘导特性(薛社普等, 未发表資料)。

組織者这种誘导作用有什么物质基础? 是什么物质? 它的化学性质是什么? 最初他們用冷、热、干、酸、碱和酒精等进行处理, 或将其磨碎、破坏、杀死后再移植^[4, 45, 48, 63, 84]。結果組織者本身虽然不能演变为任何組織, 但与其接触的細胞仍能被誘导成为第二中軸系統, 外胚层仍能分化为神經細胞。用成年动物脏器組織, 無論脊椎动物或无脊椎动物, 不論死的或活的都有不同程度的誘导作用(特别是死的)^[25, 48, 47, 54, 86, 101]。甚至用植物組織也有作用^[7, 9]。因此可以肯定誘导者的作用是化学物质所引起。二十多

图 15a, b 从豚鼠骨髓提取的核蛋白对离体蝶螈外胚层小块的軀体中胚层結構的誘导作用。

图 15a 示誘导出的肌节切面; 15b, 誘导出的肌节及脊索 (Yamada, 1958)。

图 16 “条件液”对原肠早期 (*T. rivularis*) 外胚层小块的神經誘导, 示誘导出的神經組織具有神經纖維。培养后 11 天^[68]。

图 17 左方为蝶螈 (*T. torosus*) 后神經板小块于培养 12 天后长出的肌母細胞, 右方为外胚层小块被誘导长出的肌母細胞^[69]。

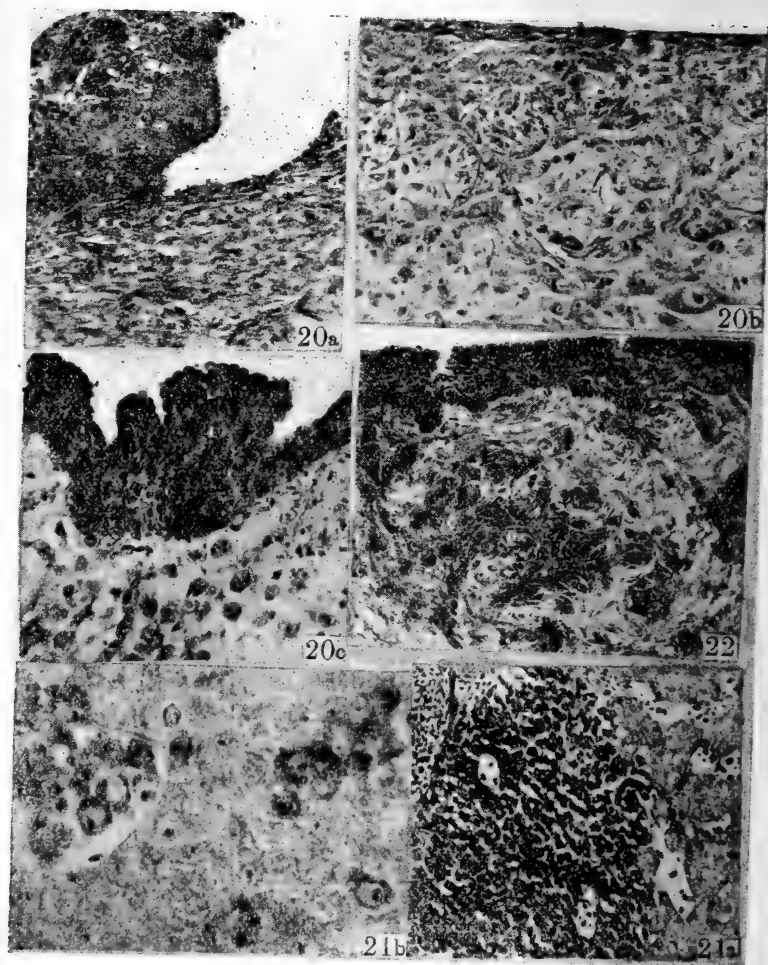


图 版 三

(以下各图均为薛社普等 1963, 1964 及未发表资料)

图 20a 从 Rous 肉瘤组织提取的 RNA 引起鸡胚尿囊绒毛膜 (CAM) 的超常增生, 接种后 3 天。

图 20b Rous 肉瘤病毒引起 CAM 的瘤性增生, 接种后 3 天。

图 20c 从人肝癌提取的脱氧核蛋白 (DNP) 引起 CAM 的超常增生, 接种后 3 天。

年来,不少生物化学家也参加了这项研究,想把有效的化学物质提出来。但是提出的几十种物质包括脂肪酸、固醇类、糖元、蛋白质浸出物、核蛋白和多环碳氢化合物如激素、致癌物质等都有作用^[54]。这些物质有酸性有碱性,化学性质全不一样,无法得出结论。这些提出来的有效物质,英国学派称之为“化学诱导物”或唤起者(evocator),与上述的诱导者(inductor)相区别。

与此同时 Holtfreter^[50~53] 及 Barth^[3] 却从离体外胚层对不同溶液的反应系统方面进行了分析,从细胞生理角度提出了引起细胞溶解或亚溶解(改变溶液中的 pH, 去钙或用溶蛋白酶处理均可引起)后即能使外胚层神经上皮化。认为改变细胞膜通透性后进入细胞内的物质作用于细胞内颗粒,使物质解放或致活,并起连锁反应,促成了细胞质内新的物质合成(代替了旧的),开始发动了新的分化方向。Holtfreter 称之为细胞亚溶解的递替机制(relay mechanism)^[51]。

上述工作在实验胚胎学方面累积了不少资料,但是很显然还不能解决组织者的诱导作用的物质机制问题。

(二) 组织者的核酸与蛋白质代谢 由于化学诱导物的工作不能解释组织者的诱导机制,许多工作者便回到组织者本身的生理代谢问题上。一系列关于能量代谢(如 O_2 消耗、缺氧、氧化还原试验、ATP 代谢、线粒体及其酶系统活性的分析、呼吸商与碳水化合物代谢量的改变、代谢抑制物的作用和对 $C^{14}O_2$ 标记物的并合等工作), RNA 及蛋白质的代谢、分布以及别的化学物理因素的作用等工作相继展开^[19]。这些工作为化学胚胎学开辟了途径并奠定了基础。

组织者的核酸与蛋白质代谢工作主要用组织化学、生化测定。

图 21a, b Rous 病毒引起宿主胚肝造血细胞增生及肝细胞病变,接种后 7 天,甲绿-嘧啶法。21a 示 RNA 组织化学反应极深的造血细胞超常增生灶; 21b 示部分增生的造血细胞成分(RNA 反应深)浸润肝细胞索。

图 22 从宫颈癌提取的 DNP 引起 CAM 的鳞癌样增生,注意外胚层增生增厚,部分细胞浸润至中胚层形成鳞癌样病变灶,接种后 5 天。

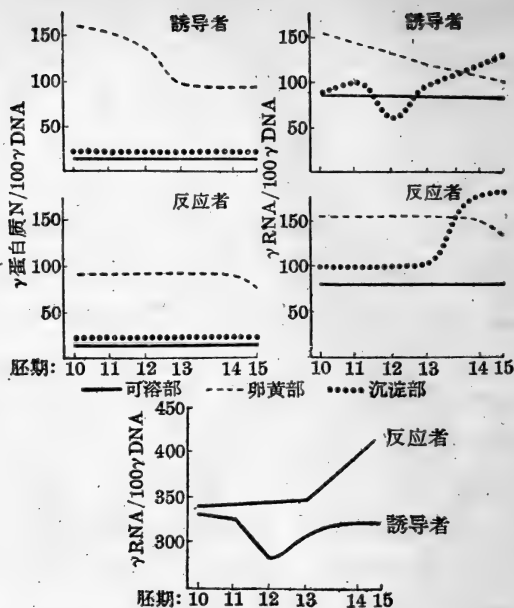


图 10 蛙胚 (第 10~15 期) 诱导者与反应者组织匀浆离心分离出的各部的 RNA 及蛋白质的含量在各期的比较 (Rounds & Flickinger, 1958)

和同位素示踪或射线自显术等方法进行分析。上面已经提到过 Brachet 在组织化学方面所进行的一系列工作，说明两栖类的背脊区核酸(RNA)反应最强，反应系(神经上皮)在诱导过程中逐渐加深，特别在脊索中胚层与神经上皮之间(即组织者与反应者的接触区)，RNA 明显地集结成层。Lavarack^[58] 在鸡胚也看到同样现象。Brachet 并发现 -SH 和蛋白质的分布也是如此^[6]。

在生化分析方面，Rounds 和 Flickinger^[78] 以蛙胚早原肠胚至神经轴胚期(第 10~15 期)的诱导区为材料，于冰冻后分别将背脊及神经板分离出来制成匀浆，离心处理后分出可溶部(内含蛋白质，类脂质和微粒体)，卵黄部(内含细胞卵黄溶解物)和沉淀部(内含线粒体、色素、胞膜和少量微粒体等)三种成分，再以三氯醋酸(TCA)沉淀，分别分析其 RNA 及蛋白质的量。结果见图 10。

組織者的 RNA 总量在誘導期(11~12 期)突然下降(由 340 γ 降至 260 γ),从 13 期起又再上升至 300 γ 水平。反应者(神經板)的 RNA 总量相反地在 10~12 期基本平稳,只略有上升,而从 13 期起突然上升至 400 γ 以上。組織者的蛋白质在卵黄部含量較高,也在 11~12 期开始下降;反应者虽无明显增高,但一直維持恒定水平。这一結果表明脊索中胚层(組織者)在細胞内卷过程中細胞内卵黄球分解变成为細胞质 RNA,并在誘導过程中被利用。这些物质是否轉移至反应系?二者在量的增减上有相关而不相当,还不能断論。

和組織化学的分析結果一样,一系列用同位素射綫自显术的观察資料也表明标记的 $C^{14}O_2$ -甘氨酸^[31, 36, 81, 82]、 S^{35} -蛋氨酸^[81]在两栖类原肠胚的背唇区組合率最高。在离体培养的鸡胚胚盘的培养基中加入 S^{35} -蛋氨酸也发现脊索及神經管区組合率最为强烈^[75]。将 C^{14} -甘氨酸标记的“組織者”植入另一同期胚的腹側表皮下,标记物质从組織者扩散至反应組織中。似乎大分子物质在誘導过程中起主要作用。Waddington^[82] 因此认为物质传递可能以氨基酸或 -SH 蛋白质的方式进行,这些物质即为真正的誘導物。

Rounds 和 Flickinger^[78]在离体試驗中将蛙胚脊索中胚层先温溶于 $Na_2^{14}CO_3$ 溶液中,再将之与外胚层小块接触 8 小时,然后分开分別制成匀浆,用 TCA 沉淀分出核物质部和不溶解部分別測定其放射活性,发现在外胚层小块的部分出現較高的活性。同上作者用免疫血清学方法,以蛙(*R. pipiens*)的組織者与蝾螈(*Taricha torosa*)的外胚层小块接触培养 4~5 天后,将之分离,然后作免疫血清試驗,发现在 *Taricha* 外胚层小块中有 *Rana* 的抗元存在(对照組为阴性)。因此作者认为确有核蛋白分子从組織者传至外胚层中去。

总之,組織者本身的 RNA 及蛋白质的代謝率較別的組織为高,在誘導过程中有物质扩移现象。至于是否由于这些扩移物质引起誘導,以大分子抑小分子形式扩移,目前只是在累积資料阶段

而还不能下最后結論。

(三) 外源核酸及蛋白质的胚內誘導作用 上面提供的資料，說明了核酸和蛋白质在形态形成过程中所起的作用，說明了具有誘導分化作用的組織者的核酸和核蛋白代謝状态及其与誘導作用之間的可能关系。改变了过去对誘導物质的看法的混乱状态，而把焦点集中在 RNA 和核蛋白的作用上。

如果核蛋白和 RNA 确是誘導的主要物质，用提純的外源核酸化合物(从富含核酸的脏器或病毒提取的核酸)也应该有誘導作用。早在 1944 年 Brachet^[10] 就証明含 RNA 多的組織提取物的誘導作用較含量少的为强。以后他用烟草花叶病毒(TMV)注入蛙胚囊胚腔得到較强的誘導(图版一，图 11)，认为是 RNA 的作用^[11]。Kuusi^[56] 同样用 TMV 証实了他的結果，但用 RNase 和过氯酸处理后无改变，而用蛋白酶处理后即失去作用。用豚鼠肝和肾提取核蛋白作同样試驗也得同样結果，因此认为不是 RNA 而是核蛋白起主要作用。可是問題并不因此而解决，因为她用星魚卵母細胞的核仁(含 RNA)、商制 RNA、豚鼠肝、肾的微粒体进行誘導时均得到阳性結果^[57]。Lehmann^[59] 甚至用从胰、胸腺和肝提取的 DNA 也有誘導作用。Vahs^[58] 发现 Gram 氏阳性細菌的誘導力在用 RNase 或紫外綫照射后則失去作用。

看来外源核蛋白的作用是肯定的，但是其中蛋白质起主要作用抑 RNA 起主要作用意见还不一致。

四、外源核酸及核蛋白对离体胚层細胞及肿瘤細胞分化的誘導作用

这方面工作所采用的外源核蛋白大部从成年动物(豚鼠、大、小鼠及蝶螈等)的肝、肾和骨髓等脏器組織經過提純而取得。采用这些脏器是以早期工作証明它們經過热或乙醇处理后在胚內具有区域誘導性为基础。最早用动物脏器經過处理后显示出区域性誘導的是 Holtfreter^[48]。以后庄孝德^[25]，Toivonen^[86]，Rotmann^[77] 等相继証实肝和肾有不同的区域誘導特性。而首先从化学性质的

角度来进行分析的是 Toivonen 和 Kuusi^[87]。他們用豚鼠肝、腎作材料,从肝中提出的物质,在胚內能誘导出前脑、眼、鼻和水晶体等头部結構,称之为头(前脑)区誘导物质 (archencephalic or ar-crogenic agent)。这种物质具有耐热性、可溶性和可透析性。从腎中提取的物质能在胚內誘导出脊髓、尾脊索及体节等組織;还可以誘导出中脑、后脑和耳囊等組織,前者称之为軀干尾区誘导物质 (tritogenic or spinocaudal agent),后者称之为中后脑区誘导物质 (deutogenic or deuterencephalic agent)。性质与头区誘导物质相反。以后 Toivonen^[88~92] 又用豚鼠骨髓为材料,經乙醇处理后植至胚內能誘导出中胚层組織(肌肉、中腎、間充质、脊索和血管血細胞等),因之又提出一种誘导物质,称之为中胚层誘导物质 (mesodermal agent)。他最近又发现正常大鼠骨髓亦有同样作用,而患白血病的大鼠骨髓則无作用。认为后者缺乏一种蛋白质(与引致恶性生长有关),而这种蛋白质正是誘导物质。

Kuusi^[56, 57] 同样用豚鼠腎組織为材料,用超速旋离和以核組蛋白或盐抽提等方法提取其中物质,并用福尔馬林、RNase 等处理其匀浆后再进行誘导力的分析。結果經福尔馬林处理后,其中后脑区及軀干尾区的誘导作用消失,但仍有微弱的前脑区誘导作用。用 RNase 处理則沒有降低任何誘导力。腎組織的离心沉淀物的作用为軀干尾区及中、后脑区誘导,而从腎組織提取的不同部分的作用則为前、中脑区誘导。因此她认为腎中有二种化学性质不同的物质,其中前脑区誘导物含 RNA,而軀干尾区誘导物則为蛋白质。

上述这些誘导物质是质的不同抑为同一物质由于量(浓度)不同而出现不同的誘导作用? Dalcq 和 Pasteels^[26], Nieuwkoop^[65], Toivonen^[88] 和 Yamada^[103] 等各有不同解释。Brachet^[19] 及 Dalcq^[28] 曾有詳細綜述,此处不贅。

以上的工作都在胚內进行,其誘导的区域性可能受宿主的区域軸性及其周围的胚层或囊胚腔液所影响而不能真正說明其区域性誘导的本质。为了免除这一因素,外源核蛋白对离体培养胚层

細胞的誘導分析工作便相应展开。进一步証实誘導物确有区域特性存在。不同脏器提取物有不同的区域誘導作用。而且証明这些物质基本上是核蛋白。但是在核蛋白里面,蛋白质和 RNA 何者是主要誘導物? 不同工作者用不同的材料和方法,得出的結果各不相同。一派认为蛋白质是主要誘導物,另一派则认为主要誘導物质是 RNA。

(一) 核蛋白的誘導作用 认为核蛋白中的蛋白质起主要誘導作用的以日本 Yamada 实验室的工作最为系統。他們将从脏器提取的物质切成小块包裹于二层原肠胚外胚层(用 *Triturus pyrrhogaster* 为材料)之間,离体培养 10~14 日后切片观察誘導的組織类型及其出现率,并对提取的物质进行了化学分析和用各种方法(如用蛋白酶、RNase 及热处理等)比較处理后誘導作用的改变来分析誘導物质的性质。

他們的早期工作集中在豚鼠肝和腎提取物的作用上。証明肝和腎提取物对离体外胚层的誘導作用确有区域誘導性的不同。

1. 腎提取物的作用 用乙醇处理的豚鼠腎組織小块或匀浆提取物,和用 0.14 M 盐水及乙醇抽提的核蛋白(RNP),对离体外胚层均呈为中、后脑区及軀干尾区的誘導作用(图版二,图 12 a, b)。用其酸沉淀部分(内含 RNA)也得到同样結果。用鏈霉素提純的 RNP (其 RNA 含量为 245 微克 P/毫克蛋白质 N),出现的誘導率更高。如用 100,000 g 离心将 RNP 再提分为上清及

表 2 豚鼠腎組織 RNP 二亚部对蝶螈外胚层外植块的誘導作用(100,000 g 1 小时), Yamada 1958

	上 清	沉 淀
RNA 含量(微克 P/毫克蛋白质 N)	358.7	124.6
外胚层外植块数	85	87
总誘導率	84(99%)	86(99%)
軀干尾誘導	25(29%)	16(18%)
中、后脑誘導	56(66%)	72(83%)
前脑誘導	9(11%)	24(28%)

沉淀二亚部 (subfraction), 二者的诱导率竟高达 99%(表 2), 主要为中、后脑区及躯干尾区诱导^[104, 108]。

上述 RNP 中何种物质起作用? Hayashi^[42, 43]分别用 RNase 及蛋白酶进行处理分析, 结果是經 RNase 处理后并不失去作用, 而用胰蛋白酶或胰乳凝蛋白酶 (chymotrypsin) 則其作用全部丧失, 故认为起作用的是蛋白质部分。

2. 肝提取物的作用 用上述同样方法, 不論是用 0.14 M 盐水或用鏈霉素提純的豚鼠肝 RNP 均对离体外胚层有較高的前脑区诱导作用 (图版二, 图 13)。但超速旋离处理分出的上清和沉淀二亚部的作用則略有不同: 前者为前脑区及中、后脑区诱导, 而后者則为专一的前脑区诱导 (表 3)。

表 3 豚鼠肝組織 RNP 二亚部对蝶螈外胚层外植块的作用 (Yamada 1958)

	100,000 g		173,490 g	
	沉 淀	上 清	沉 淀	上 清
RNA 含量(微克 P/毫克蛋白质 N)	10.2	92.7	21	197.5
外胚层外植块数	53	59	31	37
神經誘导	38(72%)	59(100%)	21(60%)	36(96%)
非神經誘导	12(23%)	0	5(10%)	1
头区誘导	29(55%)	20(34%)	17(55%)	9(24%)
中、后脑区誘导	5(9%)	42(71%)	9(29%)	27(73%)
无区域性誘导	20(38%)	5(8%)	5(16%)	5(14%)

用酶处理的結果也表明核酸酶(RNase 及 DNase)不起作用, 而經蛋白酶(胰蛋白酶及胃蛋白酶)处理后則其诱导作用消失, 同样說明起诱导作用的是蛋白质部分^[44, 45]。

最近王亚輝等用酚-吡啶法从大鼠肝分离出一种具有很强的中胚层诱导的蛋白质^[117], 經热和酒精处理后性质不变^[118], 认为这种物质平时因量少而隱蔽不显。

3. 骨髓提取物的作用 用盐水及鏈霉素从豚鼠股骨骨髓中提取的 RNP 含 RNA 較高 (399微克/RNA-P/毫克蛋白质 N),

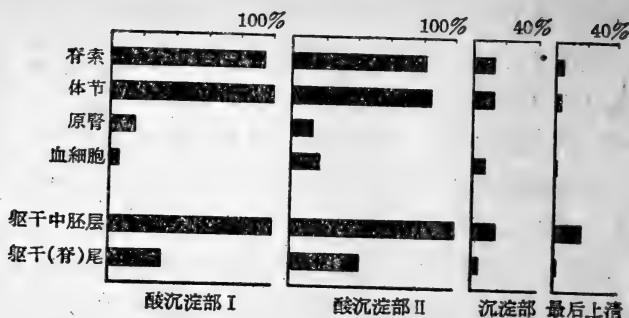


图 14 豚鼠骨髓提取物对离体蟾蜍外胚层的诱导作用
(Yamada, 1958)

但对离体外胚层的诱导力较差。以后 Yamada 等用重复超速离心和酸沉淀法分离出四部分物质, 分别对离体外胚层进行试验, 结果其酸沉淀部 I 和 II 均得到很高的躯干中胚层结构的诱导作用, 而其最后上清和最后沉淀部分则作用极微(图 14)。可见其诱导物质为酸沉淀性, 而且是不能透析的^[107, 108]。

将上述酸沉淀 I 部分用超速分析离心机旋离一小时(220,000 g)所分出的 SI 和 SII 二亚部, 和用电泳法分出的 D-E 亚部(即移动较慢的下降部), 对离体外胚层小块均有较强的中胚层组织的诱导作用(图版二, 图 15a, b)。以后 Yamada (1958) 并发现有诱导内胚层组织的作用。

用蒸气(热)处理骨髓后, 其原来的躯干中胚层诱导作用因处理时间的长短而作下列顺序的区域性改变: 躯干中胚层诱导→脊尾区诱导→中、后脑区诱导→前脑区诱导。Yamada 等^[109, 110]假想这种改变可能是由于组织中的作用成分(蛋白质)的分子在热处理后逐渐发生了质的改变而反应在区域诱导型上。

Yamada 实验室一系列工作进一步证实了不同脏器的提取物对未分化外胚层有不同类型的区域性特异性诱导作用。但是这种诱导是否为器官特异性或组织特异性? 这个对细胞分化具有重大意义的问题, 从资料看来还缺乏证据。Yamada^[104, 105, 108~110]认为这只是区域性而不是器官或组织特异性, 因为诱导出来的每一

区域的組織是多样的。Vainio^[94] 做了一个有趣的血清免疫学实验,他将豚鼠的肾、肝及骨髓分别制成抗原免疫家兔,然后利用这些同源或异源免疫血清分别处理肾、肝及骨髓組織。結果骨髓組織对蝶螈 (*T. vulgaris*) 原肠胚外胚层的区域性诱导作用受到抑制,肝、肾的诱导作用亦减弱,而肝还呈现由前脑区诱导轉变为中胚层诱导的趋向。他认为区域特异性是存在的。肝的诱导作用的改变可能是由于中胚层诱导物质从血清中吸附于肝組織所引起。

从上述一系列的实验資料看来,核蛋白中的蛋白质成分对两栖类外胚层的诱导分化作用是比较肯定的。

(二) 核糖核酸的诱导作用及其对細胞分化的影响的新近資料 最早提出核酸在诱导过程中的作用的是 Brachet^[29]。他根据組織者富含 RNA 以及 TMV 和肝微粒体具有较强诱导作用等事实,认为诱导力的强弱和所含的核酸的浓度有平行关系。

近十年来,牛满江用离体培养方法做了一系列工作,主张核酸 (RNA) 是主要诱导物质。他选用公认为在离体培养中不易产生細胞溶解现象的蝶螈 (*T. torosus*) 为研究材料,并尽量采用小块培养以避免由于包卷而引起細胞坏死。最初他将組織者与預定表皮細胞同时培养于一玻片上(悬滴法)。假定組織者在培养过程中会排出诱导物质以引起預定表皮分化。但結果并不理想^[68, 69]。以后他将诱导組織于单独培养 7~10 天后,再加入外胚层外植块(二者不接触),結果大部诱导出神經細胞和色素細胞,最好的例子有 90% 进行神經分化。細胞紧貼在玻片上,具有神經纖維(图版二,图 16)。他称經过組織者培养 7~10 天后的培养液为“条件液”,认为外胚层外植块在其中进行神經分化是“条件液”中含有足够的诱导物质所引起。抽取“条件液”单独培养外胚层外植块,所得結果基本相同。作者认为这一結果不但証明“条件液”中确含有組織者排出的诱导物质,而且也指出诱导过程不一定要诱导者与反应者直接接触(一般公认为接触是完成诱导过程的必要条件)。

以內含“条件液”的毛細管吸取单个外胚层細胞培养,可见細胞最初进行迅速的細胞分裂过程,以后逐渐分化为前色素細胞

(propigment cells)。表明“条件液”中的诱导物质是一种“分化者”(differentiator),而不是“生长促进者”(growth promotor)。

利用较后期的诱导组织(后期神经板)作为诱导者,于培养12~16天后,同样放入外胚层小块进行培养,也得到较高的诱导率。但诱导出的细胞主要为肌母细胞(myoblast)(图版二、图17),最高一次占全部诱导中的73%。

作者解释早期诱导组织(组织者及早期神经板)大半诱导出神经细胞和色素细胞,而较老的诱导组织(后期神经板)则诱导出肌肉组织,原因可能是存在二种不同性质的诱导物质,也可能是同一诱导物由于浓度不同而诱导结果不相同。

“条件液”所含的诱导物质有什么化学性质?他用深井凹玻片培养术收集较多的“条件液”进行定性分析。首次培养液的紫外分光光度读数毫无例外为258毫微米,第二次和后期神经板的条件液均为265毫微米。用酒精沉淀后再溶于盐溶液,分光光谱吸收值并无改变。透析后仍有同样诱导作用。用Bial及Dische试验说明含有RNA和DNA,对双缩脲反应为阳性。这些分析表明“条件液”中的诱导物质为可沉淀和不能透析的大分子核蛋白。

用RNase处理后,对*T. torosus*外胚层的诱导力大为降低。用DNase处理仅略有降低。同时用RNase及DNase处理,则诱导力全部丧失,但对*T. vivularis*毫无作用。相反,以胰蛋白酶及胰乳凝蛋白酶处理,结果和上述完全相反。可惜这一实验不能避免酶直接作用于细胞而未能说明“条件液”的真正化学性质。

1958年牛满江^[70]将从牛胸腺组织中提取的RNA,加入蝶螈(*Amblystoma tigrinum*)原肠胚外胚层的培养基中,培养10~16天后其神经诱导率占56%,非神经诱导占17%;将后者细胞括下植入幼虫(30~34期)背侧表皮下,结果部分长成小结节,其组织结构及细胞形态与宿主胸腺相象。如果事前用RNase处理,则其诱导率下降。恢复其RNA原有含量后诱导率又相应提高。在新鲜提取的RNA中加入本身无诱导作用的外来蛋白质(soybean trypsin inhibitor),可加强其诱导力。说明起诱导作用的是RNA,

加入外来蛋白后恢复其大分子状态时作用更强^[70]。

牛满江从上述实验认为 RNA 可能有组织特异的诱导作用。但是 Yamada 和 Osawa^[110] 从牛胸腺用同样提取 RNA 方法,用尼龙培养术重复了牛的上述实验,结果均为阴性。

以后牛满江^[71]改用小鼠腹水癌细胞为材料,以牛肝或小白鼠肝 RNA 处理 12~20 小时后,再作肌肉注射至小白鼠体内。结果长瘤率降低 90% (由正常 96% 降至 10%), 细胞分裂率和浸润程度也较低。电子显微结构及用活体染色比较细胞存活率的观察,与不处理细胞之间并无区别。但用标记 C¹⁴-亮氨酸进行并合试验,则处理过的细胞的并合率显较不处理的为低。表明经过肝 RNA 处理后的腹水癌细胞在细胞代谢上发生了改变。

最近牛满江^[72]的进一步实验证明:经过高浓度牛肝 RNA 处理的细胞,其存活率只较不处理细胞降低 15~20%,而对 DL-亮氨酸-C¹⁴的并合率则降低 3/4。在长瘤率上,经牛肝 RNA (O, D 为 100/毫升) 处理后只达 8%,而用本身(腹水癌) RNA (O, D 也为 100/毫升) 处理的则为 71%。

用核酸酶 (RNase 及 DNase) 处理肝 RNA (37°C, 20 分钟) 后再对腹水癌细胞温浴 15~20 小时,结果在细胞的存活率上处理

表 4 核酸酶对肝 RNA 的作用分析^[72]

	不处理	肝 RNA	酶 消 化			
			RNase 处理肝 RNA	RNase	DNase 处理肝 RNA	DNase
第一次处理后的存活率	79%	62%	80%	87%	70%	75%
动物长瘤数	8/8	3/8	7/8	5/8	2/8	7/8
第二次处理后的存活率	40%	12%	36%	19%	30%	45%
动物长瘤数	4/6	0/6	5/6	3/6	0/6	5/6
长 瘤 率	86	21	86	57	14	86
代 号	I	II	III	IV	V	VI

与不处理組均有輕微改变，但作动物接种时，二者的生瘤率不一样：經 RNase 消化的肝 RNA 处理細胞較不經酶消化的为高（见表 4 的 II 和 III），几近正常水平。而 DNase 則对肝 RNA 无作用。进一步表明降低长瘤率的因素是肝 RNA。

分析經肝 RNA 处理后的細胞的核酸代謝状态，指出核酸含量增高 18~43%。这种增高机制很可能和烟草病毒 RNA 在感染过程中引起新蛋白质合成的情况相似。

蛋白质代謝状态与所用 RNA 浓度有关，在肝 RNA 浓度大时，其 C^{14} -亮氨酸的并合率只及对照的 1/4（图 18），原因是細胞代謝发生了改变。但是如果以血清蛋白为标准（以血清蛋白为载体分析），将处理过的細胞用 TCA（三氯醋酸）提取蛋白质，分別提分 TCA 蛋白质为一般蛋白（G.P.）、不溶性蛋白（I.P.）和血清蛋白（S.A.）三部。S.A. 用 C^{14} -亮氨酸标记。結果 S.A. 部最初在不处理細胞的合成率高于肝 RNA 处理的細胞，但在 $2\frac{1}{2}$ 小时后，不处理細胞中的量减少，而处理細胞中的 S.A. 量增升 2~7 倍。即使

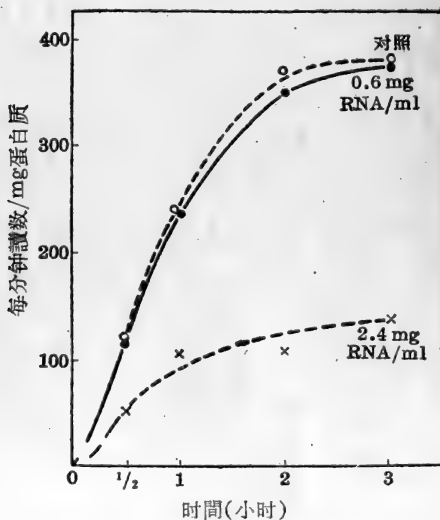


图 18 不同浓度肝 RNA 处理腹水癌細胞不同時間后并合 C^{14} -亮氨酸的状态比較^[72]

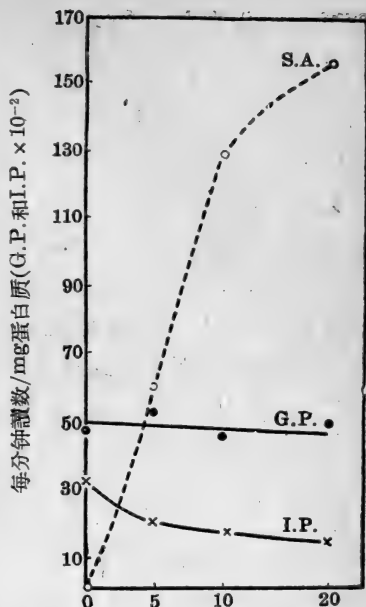
使用低浓度肝 RNA，处理数日后其 S. A. 也较对照为高，培养时间增长(3周)，其增高率便愈显著。图 19 是肝 RNA 处理细胞的三个蛋白质部分的合成率比较 ($2\frac{1}{2}$ 小时内)。图中可见处理细胞的蛋白质合成中以 S.A. 最高，而且与所用的肝 RNA 浓度成正比。直接用 C^{14} 标记的 S.A. 或用腹水瘤 RNA 加 C^{14} 标记的 S.A. 对腹水瘤细胞进行同样试验，分析 G.P., I.P. 和 S.A. 三部蛋白质的活性，并未显示 S.A. 部分增加。

S.A.(血清蛋白)是肝细胞的特异合成蛋白质，只在肝 RNA 处理后的腹水瘤细胞中出现较高的这种类型的蛋白质合成，除了说明经肝 RNA 处理后的确引起

细胞的代谢改变，而抑制瘤的生长率的可能机制之外，还为外源核酸进入细胞后引起新蛋白质合成提供了另一资料论据。

新近资料表明蛋白质的合成需要有信息 RNA 和微粒体 RNA 参与。信息 RNA 的研究这几年来已取得很大进展，上一讲已有论及。在烟草花叶病毒而特别在噬菌体(T_2)进入大肠杆菌后所引起的新的核酸及蛋白质合成，提供了了解蛋白质合成上很有希望的前景。用肝 RNA 处理腹水瘤细胞后引起宿主细胞出现肝蛋白质(S.A.)的合成，牛满江认为也有可能是肝 RNA 带有肝细胞的密码而控制腹水瘤细胞中蛋白质合成的类型。

从细胞分化的角度来看，经肝 RNA 处理后的腹水瘤细胞在接种动物后的长瘤率降低 80~90%，直接原因是细胞丧失去细胞



肝RNA的浓度(260毫微米O.D./毫升)

图 19 小鼠肝 RNA 处理腹水瘤细胞的 $2\frac{1}{2}$ 小时过程中对 DL-亮氨酸 C^{14} 并合率的影响^[71]

分裂和浸潤的能力。細胞分裂和細胞分化往往是相反的二個過程，分裂多則分化少，分化多則分裂少。失去分裂的特性可能意味着分化正在進行，這表現在細胞正在進行肝蛋白質(S.A.)的合成上。也就是說，正在進行形態和功能分化前的物質分化過程。如果這種解釋是正確的，則 Brachet 早期提出的“RNA 是細胞分化的物質基礎”這一假說便得到進一步的理解。同時過去胚胎學家憧憬通過引起細胞分化來抑止腫瘤生長的假想也有了前景。

RNA 作用於細胞的機制，目前還不很了解。用 RNase 處理使其水解（失去大分子結構）後即不起作用，同時用 C^{14} 標記後分離的 C^{14} -肝 RNA 鹼基的比活性比例，與 C^{14} -腹水癌 RNA 分離的相等或近於相等（見表 5，即無退降現象）。這些事實使牛滿江認為肝 RNA 是以大分子形式進入細胞這一點是值得注意的。

表 5 C^{14} -肝 RNA 和 C^{14} -腹水癌 RNA 水解產物的分布及其放射活性比較^[71]

材料及放射活性/分鐘	R N A 成分						
	鳥嘌呤 (G)	腺嘌呤 (A)	胞嘧啶 (C)	尿嘧啶 (U)	A/U	A/C	C/U
C^{14} -肝 RNA (200 微克)	47.7	8	133.8	225.3	0.33	0.64	0.51
C^{14} -腹水癌 RNA (200 微克)	2.1	4.9	7.7	15.1	0.36	0.61	0.59

De Carvalho & Rand 等^[80]同樣也用大鼠正常肝 RNA 處理同種 Novikoff 肝癌細胞後再作腹腔接種，發現注入的細胞多半集結於系膜血管（靜脈）周圍形成小結節（85%），只 15% 形成實體瘤（表 6）。切片觀察小結節內細胞富含極性分布的糖元，核-質及核-核仁比例及大小形態極象正常肝細胞。其他如生長慢，不易移植，並不引起動物致死等特徵表明惡性癌細胞經過正常肝 RNA 處理後呈一定程度的再分化現象（異種器官如脾及腎 RNA 並不引起這種變化）。用兔肝 RNA 處理亦得到類似結果。相反，如果用肝癌 RNA 處理正常肝細胞後再作同樣接種，也可得到 20% 的長瘤率（見表 7）。這一結果是由於肝細胞的改變抑為肝癌 RNA 的直接作用？作者以肝癌 RNA 對成年大白鼠進行腹腔內注射，

并从静脉注射产前胚胎和从皮下注射初生幼鼠进行分析（以正常肝 RNA 为对照作同样接种）。结果均能引起长癌（长癌率分别为 30%，10% 和 5%）。对照组为阴性结果。表明肝细胞的恶性变是由肝癌 RNA 所引起的。

表 6 不同器官 RNA 对 Novikoff 肝癌腹腔内接种的影响^[80]

組 別	RNA 来 源	长 癌 率(%)	平均死亡日期	退 化 率(%)
1	—	95	6	0
2	大 鼠 脾	94	6	0
3	大 鼠 肾	95	6	0
4	大 鼠 肝	15	12	85
5	肝 癌	100	6	5

表 7 肝癌 RNA 对正常大鼠肝细胞的作用^[80]

分 組	RNA 来 源	长 癌 率(%)	平均出现日期	退 化 率(%)
1	—	0	—	—
2	正 常 肝	0	—	—
3	肝 癌	20	15	5

Griffin 等^[41]最近用大鼠肝 RNA 处理 Novikoff 腹水癌细胞 7~15 小时后再回植至大鼠体内，也发现处理过的癌细胞的恶性大为降低，回植后根本不长癌。而对对照组（不处理）的长癌率达 100%。肝 RNA 经热、冰冻干燥和透析后即失去上述作用。更有趣的是从大鼠肾脏提取的 RNA 对腹水癌细胞也有和肝 RNA 的同样作用，作者认为这种作用不是肝 RNA 所专有，别的脏器的 RNA 可能也有作用而并无器官特异性。

类似的工作在人类细胞中也已有初步实验报导。Weisberger^[102]从镰刀状红血球病人的骨髓细胞提取核蛋白，经过去蛋白和进一步提纯的物质（主要含核酸），于处理正常人的巨成红血细胞(megaloblast)后，即出现贫血病人的血红蛋白，表明贫血病人血细胞 RNA 也能改变正常血细胞中蛋白质的合成过程。

以上工作似乎表明肿瘤组织 RNA 可以引起正常细胞的恶性

变,而正常組織 RNA 則可以降低肿瘤細胞的恶性程度。

再回到胚胎細胞的分化問題上,肿瘤組織 RNA 对正常胚胎細胞能否引起同样作用? 薛社普等^[115]曾用 Rous 肉瘤 RNA、核蛋白和病毒(无細胞上清)分別接种鸡胚尿囊絨毛膜(CAM),于接种后 6,12 小时及 1,3,5,7 天观察接种部位和宿主胚肝和腎等的病变及核酸的組織化学反应(甲綠-呱啉寧法)。发现三者均能引起 CAM 产生程度不同的异常生长:細胞超常增生或瘤样增生,胚层局部增厚成結节,細胞浸潤、局部潰瘍、細胞坏死、脫落和出血。細胞的 RNA 組織化学反应的强弱与細胞增生及瘤样生长的輕重程度平行上升(图版三,图 20 a,b)。Rous 病毒在第七天引致 CAM 形成瘤块。Rous 肉瘤 RNA 及核蛋白則只引起早期瘤样增生。此項工作仍在繼續,到报导前仍未见有誘发成瘤的现象。胚胎肝在 Rous 病毒作用下 5~7 天开始有出血点出现,属中胚层的肝內造血細胞增多,其 RNA 組化反应显較正常細胞强烈,形成明显的病变灶(图版三,图 21a,b)。病变肝上清传代接种 CAM 毫无例外地能引起瘤性生长。同上作者于 1963 年曾从人肝癌、宮頸癌和大鼠肝癌提取的 RNA 及 DNP 进行同样接种^[116],也能引起 CAM 产生同样的病变,严重的也产生癌瘤样增生(图版三,图 20c,22)。牛滿江^[73]最近以 Novikoff 肝癌 RNA 浸泡的琼脂小块接种 CAM,发现有 30% 产生异常生长,最后虽不形成瘤块,但在宿主胚肝中发现有大量异样的細胞群落,认为与肝癌 RNA 的作用有关。这些資料表明肿瘤 RNA 也能引起胚胎細胞核酸代謝和形态上的改变。

总的來說,外源 RNA 和核蛋白对离体及胚內胚胎或胚膜細胞和肿瘤細胞的分化都有一定的作用。但是作用物质以 RNA 为主抑以蛋白质为主? 作用的机制是什么? 目前还无法下結論。从 RNA 对細胞內蛋白质合成的作用机制來說,主张 RNA 是主要誘导物的說法似乎与信息 RNA 理論及密碼假說較易联系,而要解决这一問題,还有待于更多和更細致的实验証据。

这里必須指出的是以上的資料都是从外界物质对細胞分化作用的角度来进行外因分析的结果。在对誘导或分化問題的总的估

价时必须注意另一重要問題——細胞反应系統的内因問題。因为外界物质引起分化还不能完全认为是外因的单独直接作用,决定分化和細胞本身的内在因素是分不开的。已有資料表明不同发育期的同一胚层細胞对同一外界因素或邻近环境可以作出不同的反应,而分化出不同的結構或細胞类型。反应系統在誘导問題上一直受到实验胚胎学家的重視,在 Holtfreter 及 Hamburger^[54]的綜述中有詳細討論。虽然这方面的工作目前也还不能下結論,但是适当衡量内因和外因的作用,以及内外因素之間的关系,对全部理解細胞分化和誘导的机制問題显然是非常重要的。

五、結 束 語

核酸的生物学作用目前已累积了大量資料,特别是新近在信息 RNA 和密碼假說方面所取得的新进展,对于了解核酸在蛋白质生物合成的作用机制上提供了重要的綫索。目前一般假定的特异 RNA 遗传信息支配着 RNA 的模板形成,模板控制特异性蛋白质的合成由而决定細胞的特异性分化这一假說已逐漸得到普遍重視。当然这一理論目前还不够完整,中間还有不少关键环节能有待突破。拿上面談到的核酸对細胞分化的作用这一問題來說,外源 RNA 是否进入細胞,如果是的話,进入細胞后又如何起作用?是帶入信息或密碼,按模板复制新蛋白质以引起新的分化?抑或誘导作用,促进新的(第三种)細胞代謝的形成以引起新的分化?如果是前者,又如何与宿主細胞本身的遗传性相協調,能否和如何改变其遗传性?有什么条件和规律?如果是后者,則誘导或促进的机制是什么?这些問題我們目前还一无所知。其他环节中的許多問題也是这样。生命现象是非常复杂的,許多問題目前要下結論显然是有困难的。上面所討論的資料反映了一些基本现象和规律,下面试图予以归納,但不能作为問題的結論。

(一) 早期胚胎发育过程中 RNA 分布的軸級性和形态形成极性軸所呈的一致性无疑对于理解核酸与胚胎早期分化具有一定意义。目前还不能简单地认为 RNA 就是形态形成极性軸的物质

基础。但是有一点是肯定的，即物质的生物化学轴级性分布（包括 RNA 在内）、生理轴级性和形态形成极性轴都和细胞内颗粒（线粒体，微粒体，微阮颗粒……）有不可分割的关系。这些颗粒的出现、分化与消长，体现了胚胎早期代谢和分化的状态，而不少资料已经证明它们和核酸及蛋白质的合成有密切的关系。

（二）在器官分化过程中，一般资料表明在与组织分化的同时，核酸和蛋白质的合成也相应增高。凡是生长或分化旺盛的组织 and 分泌活跃的细胞都有高度核酸-蛋白质的合成过程。Finamore 提出“核酸是发育代谢的钥匙”的说法虽然似乎有点过分强调，但从现有的实验资料来看，确也反映出这是一种普遍现象。

（三）在早期胚胎分化过程中具有诱导作用的组织者或诱导者的诱导物质基础是什么？这个多年争论不休的问题虽然到目前为止还是不能下最后结论，但是从组织者本身和在诱导过程中相邻组织的核酸及蛋白质代谢率增高，外源核酸化合物具有诱导作用的资料看来，核蛋白的作用是肯定的。

核蛋白中的蛋白质部分起主要作用抑核酸部分起主要作用？这是目前存在的主要分歧。以 Yamada 为代表的一些学者认为器官提取物的区域性诱导作用主要是蛋白质所引起。只有区域特异性而无器官特异性。诱导物经热处理后可以改变这种区域特异性，这种改变可能是由于蛋白质的分子结构发生了改变（质变）所引致，这其中还有 Toivonen, Nieuwkoop 及 Dalcq 等人的不同看法。而以 Brachet 和牛满江为代表的一些学者，则认为组织者的诱导物质主要是核酸（RNA）。后一作者并主张区域性诱导作用可能是核酸的特异性所引起，因而提出特异诱导者可以产生特异性分化的假说。他以胸腺、肝和肝癌 RNA 分别引起离体细胞代谢和对细胞分化所可能起的作用。但是他所用的实验材料和胚胎反应者（胚层细胞）的性质不同，直接用来解释胚胎诱导者的区域性诱导关系还有一定距离。

显然，要从上述资料来说明诱导物质是蛋白质抑 RNA 起主要作用还需要进行更直接和更细致的工作。

此外上面已經提到，在注意外因作用的同时还必須重視細胞本身(反应系統)內在因素对分化所起的比重。上述引起分化的資料是外源物质(外因)还是反应細胞的反应性(內因)起主导作用，內外因素之間的关系是什么，都是极值得重視的問題。

(四) 器官或組織 RNA 处理离体細胞后引起宿主細胞蛋白质合成上的改变是近年来继噬菌体感染大肠杆菌引起新蛋白质合成后的另一重要进展。它給信息 RNA 和密碼假說提供了一些新的資料，进一步表明进入离体細胞的器官或組織 RNA 可能以它們帶來的信息或密碼来控制宿主細胞的蛋白质合成。

資料表明，以一定浓度正常組織 RNA 处理腹水癌細胞后可以降低肿瘤細胞的恶性程度(降低长瘤率 80~90%)；而从肿瘤組織提取的 RNA 可以引起正常細胞的恶性变。无疑，这对于了解癌变机制和控制肿瘤生长将具有重要意义。从細胞分化角度来看，这些工作提供了核酸改变細胞代謝由而誘导細胞分化的直接資料，也为今后了解核酸与細胞分化的关系机制和进一步控制細胞分化提供了美好的前景。

参 考 文 献

- [1] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M., Sprunt, K. and Van Damme, O., *Virology* 5: 172, 1958.
- [2] Allfrey, V. B., Daly, M. M. & Mirsky, A. E., *J. Gen. physiol.*, 37: 157, 1953.
- [3] Barth, L. G. J. *Exp. Zool.*, 87: 371, 1941.
- [4] Bantzman, H., J. Holtfreter, H. Spermann and O. Managold, *Naturwiss*, 20: 972~994, 1932.
- [5] Bieber, S. J. *Cell comp. physiol.*, 44: 11, 1954.
- [6] Brachet, J., *Arch. Biol. (Liege)* 51: 167, 1940.
- [7] Brachet, J., *Enzymologia*, 10: 87, 1941.
- [8] Brachet, J., *Arch. Biol. (Liege)* 53: 207, 1942.
- [9] Brachet, J., *Bull. de L Acad. Roy. de Belgique*, 5th Serie, 29: 707~718, 1943.
- [10] Brachet, J., *Embryologic Chimique*. Desoer, Liege, 1944.
- [11] Brachet, J., *Bull. Acad. Roy. Belg.*, 29: 707, 1954.

- [12] Brachet, J., *Experientia*, **4**: 353, 1948.
Brachet, J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**: 725, 1949.
- [13] Brachet, J., *Chemical Embryology*, New York, Interscience publishers, Inc., 1950.
- [14] Brachet, J., *Arch. Biol.*, **65**: 1, 1954.
- [15] Brachet, J., *Nature*, **174**: 876, 1946.
- [16] Brachet, J., *ibid.*, **175**: 851, 1955.
- [17] Brachet, J., *The nucleic acids*, vol. 2. p. 475. Acad. Press. Inc. Pub. New York, 1955.
- [18] Brachet, J., *Biochemical Cytology*, Academic Press. New York, 1957.
- [19] Brachet, J., *The Biochemistry of Development*, Pergamon Press, London, 1960.
- [20] Caldwell, P. C., Mackor, E. L. and C. Hinshelwood, *J. Chem. Soc.*, p. 3151, 1950.
- [21] Colter, J. S., Bird, H. H. & Brown, R. A., *Nature, Lond.* **179**: 859, 1957.
- [22] Caspersson, T., *Naturwissensch.*, **28**: 33, 1941.
- [23] Caspersson, T., *Cell Growth and Cell Function*, New York, Norton & Co., 1950.
- [24] Ceas, M. P. and A. Naselli, *Arch. Embryol. Morph. Exp.*, **1**: 207, 1958.
- [25] Chuang, H. H. (庄孝德), *Biol. Zentrbl.*, **58**: 472, 1938.
Chuang, H. H. (庄孝德), *Roux' Arch. Entw.-Mech.*, **139**: 556, 1939.
Chuang, H. H. (庄孝德), *ibid.*, **140**: 25~38, 1940.
- [26] Daleq, A. M. and J. Pasteels, *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.* **3**: 261, 1938.
- [27] Daleq, A. M. and A. Seaton Jones, *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.*, **35**: 500, 1949.
- [28] Daleq, A. M., In "Fund. Asp. Normal and malignant growth." p. 305~483, 1960.
- [29] Davidson, J. N. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Spattiswoode, Ballantyne & Co. Ltd. England, 1960.
- [30] De Carvalho, S. & H. G. Rond *Nature*, **189**: 815, 1961.
- [31] Eakin, R. M., P. B. Kutsky & W. E. Berg, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**: 502, 1951.
- [32] Emanullsson, H., *Acta Physiol. Scand.*, **44**: 336~364, 1958.
- [33] Ficq, A., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **2**: 194, 1954; *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **2**: 204, 1954.
- [34] Finamore, F. G. & E. Frieden, *J. Biol. Chem.*, **235**: 1751~1755, 1960.
- [35] Finamore, F. G., *Quart. Rev. Biol.*, **36**(2): 117~122, 1961.

- [36] Frielbeg, F. & R. M. Eakin, *J. Exp. Zool.*, **110**: 33, 1949.
- [37] Gale, E. F. & Folkes, J. P., *Biochem. J.*, **53**: 483, 1953.
Gale, E. F. & Folkes, J. P., *ibid.*, **53**: 493, 1953.
- [38] Gallera, J. & D. Oprecht, *Rev. Suisse Zool.*, **55**: 243, 1948.
- [39] Gierer, A. and Schramm, G., *Nature, Lond.*, **177**: 702, 1956.
- [40] Grabowski, C. T., *Am. G. Anat.* **101**: 101, 1957.
- [41] Griffin, A. C. and M. A. O'neal, International Cancer Congress, Abstr. of Papers, Moscow, p. 111, 1962.
- [42] Hayashi, Y., *Embryologia*, **3**: 57, 1956.
- [43] Hayashi, Y., *Embryologia*, **3**: 69, 1956.
- [44] Hayashi, Y., *Embryologia*, **4**: 33, 1958.
- [45] Hayashi, Y. & K. Takata, *ibid.*, **4**(2): 149, 1958.
- [46] Hoagland, M. B., *The Nucleic acid*, vol. 3, ed. by E. Chargaff & J. N. Davidson, 1960.
- [47] Holtfreter, J., *Roux Arch. Entw.-Mech.*, **127**: 584, 1933.
- [48] Holtfreter, J., *ibid.*, **132**: 225~306, 1934.
- [49] Holtfreter, J., *ibid.*, **132**: 307~383, 1934.
- [50] Holtfreter, J., *J. Exp. Zool.*, **93**: 252~323, 1943.
- [51] Holtfreter, J., *ibid.*, **98**: 161~207, 1945.
- [52] Holtfreter, J., *J. Morph.*, **79**: 27~62, 1946.
- [53] Holtfreter, J., *J. Exp. Zool.*, **106**: 197~222, 1947.
- [54] Holtfreter, J. & V. Hamburger, In "Analysis of development" p. 230~297, W. B. Saunders Co. Philadelphia & London, 1955.
- [55] Katayama, H. *Japan J. Zool.*, **12**: 39, 1956.
- [56] Kuusi, T. *Experientia*, **7**: 299, 1951.
Kuusi, T. *Ann. Zool. Soc. Zool. Botan. Fennicae Vanamo* **14**: 1, 1951.
- [57] Kuusi, T., *Arch. Biol. (Liege)* **64**: 189, 1953.
- [58] Lavarack, J. O., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **5**(2): 111, 1957.
- [59] Lehmann, F. E., *Roux Arch. Entw. Mech.*, **138**: 106, 1938.
- [60] Liedke, K. B., M. Engelman & S. Groff, *J. Exp. Zool.*, **127**: 201, 1954.
- [61] Liedke, K. B., M. Engelman & S. Groff, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **5**: 3681, 1957.
- [62] Liedke, K. B., M. Engelman & S. Groff, *J. Exp. Zool.*, **136**: 117, 1957.
- [63] Marx, A., *Arch. Roux Entw.-Mech.*, **123**: 333, 1931.
- [64] Needham, J., *Biochemistry and Morphogenesis*, Cambridge Univ. Press. London, 1950.
- [65] Nieuwkoop, P. D., *Acta Embryol. Morph. Exp.*, **2**: 13, 1958.
- [66] Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H. and Jones, O. W., *Proc. Nat. Acad.*

Sci., 48: 104, 1962.

- [67] Matthaei, J. H., O. W. Jones, R. G. Martin & Nirenberg, *ibid.*, 48: 666, 1962.
- [68] Niu, M. C. (牛滿江) & V. C. Twitty, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39: 985, 1953.
- [69] Niu, M. C. (牛滿江) & V. C. Twitty, In "Cellular Mechanisms in Differentiation and Growth", ed. by Rudnick p. 155, Princeton Univ. Press, 1956.
- [70] Niu, M. C. (牛滿江), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44: 1264, 1958.
- [71] Niu, M. C. (牛滿江), *Science*, 131: 1321, 1960.
- [72] Niu, M. C. (牛滿江), C. C. Cordova, & L. C. Niu, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47(10): 1689~1700, 1961.
- [73] Niu, M. C. (牛滿江), International Cancer Congress, Abstr. of Papers, Moscow, p. 116, 1962.
- [74] Speyer, J. F., P. Lengyel, C. Basilio and S. Ochoa, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48: 63, 48: 282, 48: 441, 48: 613, 1962.
- [75] Pantelouris, E. M. & L. Mulherkar, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 5: 51, 1957.
- [76] Pasteels, J., *Arch. Biol.*, 51: 335, 1940; *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1(5): 125, 1953.
- [77] Rotmann, E., *Naturwiss.*, 30: 60~62, 1942.
- [78] Rounds, D. E. and R. A. Flickinger, *J. Exp. Zool.*, 137: 479~500, 1958.
- [79] Rulon, O., *Protoplasma*, 24: 346, 1935.
- [80] Schäffer, W., In "Virus Growth and Variation", 9th Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol., p. 61~81, 1959.
- [81] Sirlin, J. L., *Experientia*, 11: 112, 1955.
- [82] Sirlin, J. L., S. K. Brahma and C. H. Waddington, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 4: 248, 1956.
- [83] Spermann, H. and Mangold, H., *Arch. J. Mikr. Anat. U. Entw.-Mech.*, 100: 599~638, 1942.
- [84] Spermann, H. and Mangold, H., *Embryonic Development and Induction*, Yale Univ. Press, New Haven, 1938.
- [85] Steinert, M., *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 33: 549, 1951.
- [86] Toivonen, S., *Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A.*, 55: 1~145, 1940.
- [87] Toivonen, S. & Kuusi, T., *Ann. Zool. Soc. Zool. Bot. Fenn. "Vanamo"*, 13: 1~19, 1948.
- [88] Toivonen, S., *Rev. Suisse Zool.* 57 Suppl., 1: 44, 1950.
- [89] Toivonen, S., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1: 97, 1953,

- [90] Toivonen, S., *ibid.*, **2**: 239, 1954.
- [91] Toivonen, S., *ibid.*, **6**: 479, 1958.
- [92] Toivonen, S., and L. Saxen, *Exp. Cell Res. Suppl.* **3**: 346, 1955.
- [93] Vahs, W., *Embryologia*, **3**: 201, 1957; *Roux Arch. Entw. Mech.*, **149**: 337, 1957.
- [94] Vaino, T., *Exp. Cell Res.*, **15**: 184, 1958.
- [95] Vendrely, R., "Un symposium sur les proteines", Masson, Paris, 1946.
- [96] Vervonck, L., *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **148**(9~10): 932, 1954.
- [97] Volkin, E., *Symposium No. VII 4th Intern. Cong. Biochem. Vienna*, 1958.
- [98] Waddington, C. H. & Schmidt, B. A., *Arch. Entw.-Mech. (Roux's)* **128**: 522, 1933.
- [99] Waddington, C. H., M. Feldman & M. M. Peiry, *Exp. Cell Res. Suppl.* **3**: 366, 1955.
- [100] Wecker, E. & Schäffer, W., *Z. Naturf.*, **12b**: 415, 1957.
- [101] Wehmeier, E., *Roux Arch. Entw.-Mech.*, **132**: 384, 1934.
- [102] Weisberger, A. S., *International Cancer Congress, Abstr. of Papers, Moscow*, p. 110, 1962.
- [103] Yamada, T., *Biol. Bull.*, **98**: 98, 1950.
- [104] Yamada, T. & K. Takata, *Exp. Cell Res. Suppl.* **3**: 402, 1955.
- [105] Yamada, T. & K. Takata, *J. Exp. Zool.*, **128**: 291, 1955.
- [106] Yamada, T. and K. Takata, *Embryologia*, **3**: 69, 1956.
- [107] Yamada, T., *Experientia* **14**: 81, 1958.
- [108] Yamada, T., In "The Chemical Basis of Development", John Hopkins Press, Baltimore, 1958.
- [109] Yamada, T., *Embryologia*, **4**: 175, 1959.
- [110] Yamada, T., In "Advances in Morphogenesis" **1**: 1~50, 1961.
- [111] Zamecnik, P. C., Keller, E. B., Hoagland, M. B., Littlefield, J. W. & Lofftfried, R. S. *Ciba Symp. on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, p. 161, 1956.
- [112] 曾弥白, 全国胚胎学学术会論文摘要汇集, 1959.
- [113] 薛社普, 細胞学进展, 111~143 頁, 1962.
- [114] 薛社普, 宁爱兰, 宗书东, 实验生物学报, **8** (3~4): 441, 1963.
- [115] 薛社普, 梁德才, 宁爱兰, 解剖学报, **7**(1): 23, 1964.
- [116] 薛社普, 宁爱兰, 陈钦銘, 梁德才等, 中华病理学杂志, **7**(1): 52, 1963.
- [117] 王亚輝等, 实验生物学报, **8** (3~4): 356, 1963.
- [118] 莊寿德, 实验生物学报, **8** (3~4): 370, 1963.

第十一讲 核酸与肿瘤病 因的关系

刘士廉

中国医学科学院实验医学研究所生物化学系

一、引言

肿瘤是医学上多年来迫切要求解决的重要问题之一。实际上,肿瘤并不限于人类,而是整个生物界一个相当普遍的现象。多种动物和某些植物,从最低等到最高等,都有肿瘤为患^[38]。

肿瘤组织在生物学上的基本特征,无论在动物个体或植物个体上,都非常近似,那就是生长不受原机体调节体系的制约,细胞代谢旺盛,与原相应组织比较,呈无定型的结构状态,向周围蔓延或向远方转移,严重地威胁着生物的成长及寿命。这种生物学上的共性,在生物界是极为罕见的现象。

一个正常细胞处于何种状况,受了哪些因素的作用,本身又经历了什么步骤,从而发生了质变,形成肿瘤细胞,这一过程涉及一系列十分复杂的理论问题,关系着生物学的各个学科;因此,肿瘤研究虽然已经进行了几十年,却始终未能从根本上阐明恶性变的原因及其发生机制。因此,在医学上迄今还缺少防治肿瘤的根本有效的措施。

自从本世纪40年代以来,生物学特别是生物化学有了振奋人心的进展,出现了两个具有划时代意义的飞跃;一个是探索问题的角度、观点和手段迅速地从细胞水平跨入了分子水平,另一个是澄清了决定个体遗传性质的根本物质不是蛋白质而是核酸。这两个巨大的变化,对肿瘤学以及生物学其他学科分支的发展,产生了极

为深刻的影响,从而使生物学一系列根本理論問題的研究,面貌为之一新。

肿瘤細胞的生成,反映着整个細胞代謝調节机制有了改变,即不仅在細胞内部自动調节方面,而且在細胞与周围环境的反饋关系方面,新的规律代替了原有的规律。从近年来病毒生化研究可以得出結論^[4,15,16,20,34]:构成有生命个体的最必需的物质是核蛋白体,而核酸是遗传信息的载体和传递者,在个体生长、繁殖、变异、遗传等各个环节上起着主导的作用。所以核酸和細胞恶性变有着极为密切的关系,有趋势认为核酸分子的改变,是癌变最關鍵的始动环节。因此,本文拟在以上数讲全面介紹了核酸的結構与功能的基础上,着重就核酸与肿瘤病因的关系方面的若干工作与观点作一簡單的叙述。

二、核糖核酸与細胞生长和分化的关系

自从 Caspersson^[10] 和 Brachet^[9] 首先发现核糖核酸(以下简称 RNA)和蛋白质的生物合成的关系以来,利用微生物、动物細胞所进行的体内体外大量实验結果一致表明,可溶性核糖核酸(s-RNA)起着轉运氨基酸的作用^[33,44],核糖微粒(ribosome 即 RNA 蛋白复合体)是蛋白质合成的主要场地^[50,76]。大家认为在核糖微粒上氨基酸按一定順序排列和連接起来,合成肽鏈,其后,再經過目前还不了解的步骤,最終合成分子大小不同、构型不一的特异性蛋白质。

Gierer 和 Schramm^[20] 及 Fraenkel-Conrat^[17] 等于 1956 年同时自烟草花斑病毒成功地分离出有致病活性的 RNA,为 RNA 传递遗传信息和决定特异蛋白质合成的性质提供了直接的証据。这种 RNA 經多方証明是高聚合的单鏈多核苷酸分子,分子量約在 200 万左右,含有約 6000 多个核苷酸^[8]。以它直接感染烟叶組織,可以引起和完整病毒完全一样的病变作用,說明在烟叶的受染細胞內必有 RNA 的复制和病毒蛋白质的合成,否則就沒有病毒的产生,也就不会致病。在这里明确地反映了 RNA 是

遗传信息的载体，起着决定性的作用。烟草花斑病毒的蛋白部分的一级结构已基本研究清楚^[3,73]，含有 2200 个亚基，每一亚基含 158 个氨基酸，这种蛋白质不具有感染性。

Gierer 和 Mundry^[21] 等以亚硝酸作用于烟草花斑病毒 RNA，使 RNA 分子上脱掉一个氨基以后，再以之作感染实验发现烟叶上有新的病灶出现，说明产生了病毒的变异株。分析这种变异株病毒的蛋白部分，有一氨基酸恰好被另一氨基酸所取代。这个实验显示了 RNA 所带有的遗传信息是由其核苷酸的组成和排列决定的，信息传递是通过蛋白质的氨基酸的组成和排列反映出来的。

Nirenberg 和 Matthaei^[51,54,55] 在大肠杆菌的无细胞体系中观察到加入人工合成的多尿嘧啶核苷酸 (polyuridylic acid) 以后，有多苯丙氨酸合成的情况。Ochoa 实验室目前也正在这类密码实验上作进一步观察^[47,48,70,71]。他们用含两种或三种核碱的多核苷酸加入同样实验系统，以更多数据揭示了核苷酸的组成排列决定氨基酸组成排列的依赖关系，为 RNA 是蛋白质生物合成的模板这一学说提供了直接的实验证据。

1960 年以来，在多种病毒中广泛地证明活性 RNA 的结果的基础上，在正常及肿瘤细胞方面，下列几位作者报告的关于 RNA 对细胞分化的影响的工作，很值得注意。

De Carvalho^[11] 以大鼠 Novikoff 肝癌的 RNA 提取液，在体外处理正常肝细胞，然后将这种肝细胞再注入正常大鼠腹腔，15 天以后，观察到在这些动物中 20% 有肝细胞形成癌样结节的变化。反之，若用正常大鼠肝的 RNA 提取液作用于 Novikoff 肝癌细胞，然后再注入正常大鼠体内，则见癌细胞的成活生长率较对照组大为降低(表 1)，而且在少数成癌的組織里还发现有趋向肝细胞索状排列的变化。

牛满江^[56] 以小鼠艾氏腹水癌细胞为对象，进行了和 De Carvalho 相类似的实验。癌细胞经过正常肝 RNA 作用后，再注入鼠体，也见到癌细胞的移植生长受到抑制的现象(下降至 10% 左

表1 不同組織的 RNA 提取液对 Novikoff
肝癌在腹腔內移植生长的效应

組 別	RNA的組織来源	RNA处理后肿瘤 移植生长率(%)	平均死亡時間 (日)	消 退 率(%)
1	—	95	6	0
2	大 鼠 脾 脏	94	6	0
3	大 鼠 肾 脏	95	6	0
4	大 鼠 肝 脏	15	12	85
5	肝 癌	100	6	5

右)。将少数成癌細胞进行化学分析,发现經過 RNA 处理的細胞获得了合成血清蛋白的功能,很象誘导分化效应。后来,牛滿江^[57]又将 Novikoff 肝癌的 RNA 接种于鸡胚尿囊膜,5~7天以后,30%在接种区附近有异常生长现象,但經再传代后沒有得到肯定的恶性变化。

最近,Griffin 和 O'Neal^[25]也重复了 De Carvallo 实验,并发现肾脏 RNA 的提取物亦有对移植肿瘤細胞生长抑制的作用。

镰刀形細胞貧血病 (sickle-cell anemia) 是一种遗传性疾病。现在从蛋白质的結構上已經分析出这种病的原因由于正常血紅蛋白发生了变化,就是球蛋白上的谷氨酸被賴氨酸替代了^[38],从而产生了基因变异,因此有人也称这种疾病为“分子病”。Weisberger^[77]把自镰刀形細胞貧血病患者的紅血球提取的核蛋白(含 DNA 80%; RNA 10%; 蛋白 10%)作为作用物,与正常未成熟紅血細胞保温,然后再分析紅血細胞的蛋白质的組成,經电泳、柱层析及指印等方法观察,发现有异常血紅蛋白合成。核蛋白作用物經核糖核酸酶、脫氧核糖核酸酶及胰蛋白酶作用,結果表明有效部分是 RNA。由此,他认为这种异常血紅蛋白的出现,是由于 RNA 帶入新的遗传信息所造成的,这种 RNA 起着一个新的模板的作用。

从上面所列举的一些重要的实验結果,可以很明显看出核糖核酸和蛋白质生物合成的关系,無論在正常生长、繁殖和遗传或恶性变异和生长,都是极为重要的环节,在今后揭示肿瘤发生的根本

原因的研究工作中,无疑占有非常重要的地位。

三、脱氧核糖核酸与细胞变异和遗传的关系

脱氧核糖核酸(以下简称 DNA)与蛋白质结合构成细胞核的染色质部分。细胞分裂时染色体数加倍, DNA 量也相应增加一倍^[74]。成熟的精细胞几乎不含 RNA,只含 DNA;在其进入成熟的卵细胞以后,就立即诱发起有严格特异规律的个体发生过程,种属得以延续。可以说无论在体细胞或性细胞,人们早已注意到, DNA 与遗传的关系是非常密切的了。

开始深入探讨遗传变异的生化本质的工作,是在 1944 年由 Avery^[4]等人首先获得成功的。他们将带荚膜的肺炎球菌的 DNA 提取出来,然后加之于不带荚膜的同属肺炎球菌的培养基,经过保温以后,发现后者就会变为前者,而且可以传代,说明 DNA 有将一种细菌的特征带给另一种细菌的作用,换言之,即 DNA 是决定和传递遗传性质的物质,当时称之为转变因子。在 Avery 等这一工作获得肯定结论以后,其他学者在流行性感菌^[23]、大肠杆菌^[7]、酵母菌^[58]等微生物中进行了类似的工作,证明 DNA 不仅能引起血清学性质的改变,而且也可使对药物的敏感性或某种特殊营养物质的利用发生改变。

病毒是核蛋白体。大肠杆菌的病毒——噬菌体是 DNA-蛋白体,和细胞的染色体在化学组成和生物功能上极相类似,因此从这种病毒的复制过程来了解 DNA 和遗传信息传递的关系,如同用烟草花斑病毒 RNA 研究 RNA 与蛋白质生物合成的关系一样,是极为理想的实验模型材料。近几年来,这方面的工作正和上述 RNA 的工作并驾齐驱,突飞猛进。1952 年 Hershey 和 Chase^[32]用 S^{35} 标记蛋白部分, P^{32} 标记 DNA,观察到 T_2 类大肠杆菌噬菌体在感染宿主细胞时,进入菌体的物质 97% 是 DNA,蛋白只占 3%。换言之,即噬菌体的蛋白外壳全部被留于细胞膜以外,和精子 DNA 进入卵细胞的情况很相似。以后的实验证明,就是这部分 DNA 决定着子代病毒的合成。1956 年以来若干学者对

T₂ 型噬菌体在大肠杆菌内的复制过程作了更为深入的生物化学分析^[67]。发现噬菌体 DNA 并不是直接一下子就合成病毒的，而是经过一系列的步骤。DNA 进入菌体后，先要有新种 RNA 和一些酶的合成。这种新种 RNA 所含的核碱组成比值和 T₂ 病毒-DNA 的核碱组成比值相对应〔现称之为信使 RNA（简作 mRNA）〕，同时认为它接受了 DNA 所带着的信息，是蛋白质合成前所必需的中間物质，是信息的传递者。由此总结出的遗传信息传递的完整的生化机制或路线应该是：DNA→RNA→特异蛋白质，其中 DNA 是遗传信息的载体，是决定者，是起点，RNA 是中間传递体，蛋白质是信息的体现者。

T₂ 型噬菌体的实验结果，无疑有其普遍意义，反映着个体复制过程的内在机制。在高等生物的细胞，如胚胎细胞分化为具有特殊功能的细胞，正常细胞演变成成为肿瘤细胞，虽其情况比病毒复制、变异远为复杂，但其调节机制的变化，造酶系统的重组或增减，必然最终有赖于信息传递系统。因此细胞学家向来重视细胞浆与细胞核的关系的研究，尤其是细胞化学家在细胞水平上对探讨 DNA→RNA 的关系做了不少很有意义的工作。

Allfrey 等在分离小牛胸腺的细胞核的实验里首先观察到核内氨基酸也可并合到蛋白质的情况。其后，一些作者以 C¹⁴-氨基酸也进行了不少类似的研究，证实了核内确有独立进行的蛋白质生物合成的体系，而且其反应过程和途径与浆内机制完全一样，即核内也有核膜微粒作为蛋白质合成的场地^[1]。因此，人们就推测究竟核内的核膜微粒与浆内的有何关系和区别？二者虽然在蛋白质合成的功能上基本一致，然其它方面如结构、特异性等是否完全相同？核内核膜微粒是不是浆内核膜微粒的前身？这些问题对于了解细胞分化、变异和肿瘤细胞的形成机制很重要，但目前由于实验方法条件的限制，还没有得到最后的结论。有人认为细胞浆内的核膜微粒都是核内合成好而后移入胞浆的，也有人报告细胞浆内核膜微粒可以自行复制，其说不一^{〔56,76〕}。

DNA 只存在于核内。若承认 DNA → RNA → 特异蛋白质

这条信息传递的路綫是正确的，浆內高分子 RNA 是否都来源于核呢？这也是十分有兴趣的問題。实验資料相当多，但也不尽一致，因此解释上还不能完全統一。大量的同位素自显影工作結果表明，的确 RNA 前身物质先并合到核，而后见于胞浆。Amano 和 LeBlond^[2] 还在多种动物組織观察到 RNA 前身物质总是先出现在核仁及染色顆粒部分。因此多数人认为全部 RNA 都是在核內合成的，这样也比较符合遗传信息传递的一般机制（即 DNA→RNA→蛋白质）。但另有一些作者报告了不同的結果，也提出了不同的看法^[30,35,59]，如 Perry^[60] 等以微束紫外綫照射单个 HeLa 細胞，只破坏其核仁部分，得到的結果說明浆內大部分 RNA 是由核內合成的，但也有 10% 左右可在浆內自行复制。此外又如 Gieogiev^[19] 等进行了艾氏腹水癌細胞核結構和功能的研究，观察到在核仁-染色质复合体上可以合成分子大小不同的 RNA，其高分子 RNA 的核苷酸組成比值与核朊微粒上的 RNA 有显著不同，前者的 G+C/A+U 为 1.1~1.2，后者的比值为 1.5~1.6（G 代表鳥嘌呤，C 代表胞嘧啶，A 代表腺嘌呤，U 代表尿嘧啶）。作者还进一步分析了 DNA 的核苷酸組成是 AT 型，而核仁-染色质顆粒上的 RNA 則有两个組成部分；一为强 GC 型，另一为强 AU 型。

DNA 如何控制 RNA 的合成？RNA 又如何决定特异蛋白质的合成以传递信息？大家认为都是核苷酸的組成和排列順序决定的^[47,48,51,54,55,70,71]。mRNA 与 DNA 在核碱比例上互相对应，在微生物实验中已得到証明^[42]。动物細胞上的观察虽不多，但是 Schaltissek^[65] 在肝細胞核，Sibatani 等^[66] 在胸腺細胞核也已发现有寿命短的，核碱組成比例和 DNA 相对应的 mRNA 存在。但在肿瘤細胞方面尚无类似的报导。

DNA—RNA—蛋白质(酶)信息传递学說正在澄清以往有关肿瘤发生原因的种种假說和推論，如 Miller 和 Miller^[53] 根据偶氮染料和細胞蛋白质結合的现象所提出的“特异蛋白质丢失”假說，Warburg^[75] 所认为的細胞呼吸障碍是肿瘤的原发机制的假

說等等已逐漸或已不為人們所接受，Kaplan^[43]最近已提出應修正 Miller 和 Miller 的假說，主張“核蛋白模板的丟失”是惡性變的根本原因。此外近來頗引人注意的腫瘤病毒病因學說正是由於得到病毒生化、遺傳生化尤其是活性核酸的實驗的支持受到愈來愈廣泛的重視。

四、腫瘤病毒病因及致癌活性核酸的研究

在實驗動物上肯定能引起腫瘤的因素可分為三大類：物理因素、化學因素和病毒因子。條件不一，但三者在生物學上的後果是一致的，即都是使正常細胞變為生長不受控制的腫瘤細胞。三種手段不同，而異途同歸，那麼三者的中矢之“的”是否都是核酸呢？從上述的在病毒學、微生物遺傳學中所獲得的有關核酸的生物學特性看，應該說，這種可能性是很大的^[22]。X綫、紫外綫、某些化學物質（如烷化類等）對微生物是致變異因素，對動物就是致癌因素^[22]；若干抗核酸代謝物（如 5-氟尿嘧啶等）有抑制某些腫瘤生長的作用，而在病毒繁殖方面的實驗中，則證明有使病毒產生變異的功能^[40]。這些生物效應上的一致性，從化學方面的直接的或間接的分析結果看，都可追溯出核酸分子的變化是最關鍵環節。病毒核蛋白進入細胞引起惡性變的事實，更加明確地反映了核酸在腫瘤細胞形成過程中所佔的地位。

用腫瘤組織分離出含核酸較高的亞細胞顆粒即可移植為同種腫瘤的現象，是 Rous^[62] 於 1911 年在雞肉瘤上（後稱之為 Rous 肉瘤）首先肯定的。其後陸續在不同動物如昆蟲、青蛙、魚類、禽類、小鼠、兔、狗，人等的若干種腫瘤組織中都發現有病毒因子^[18]，在植物中也有類似情況^[8]。據不完全統計，現在基本上肯定的腫瘤病毒因子已不下 30 餘種。採用新生動物（如初生鼠）、組織培養和電子顯微鏡等新技术，1950 年以來所作的形態、生化、免疫等方面的分析，都說明腫瘤病毒在基本性質上和傳染病病毒沒有明顯的差別^[14,18]。

常見的幾種動物腫瘤病毒，有的只含 RNA，有的只含 DNA。

表2 几种肿瘤病毒的分析^[43]

肿 瘤 病 毒	宿 主	細胞内寄居部位	核 酸
多发肿瘤	小鼠、大鼠、地鼠	核	DNA
Shope 乳头状瘤	兔	核	DNA
Rous 肉瘤	小 鸡	浆	RNA
髓母細胞增生症	小 鸡	浆	RNA
淋巴瘤	AK 小 鼠	浆	?
乳腺癌	C ₃ H 小 鼠	浆	?

病毒繁殖的部位也不一样，RNA 病毒多寄居于細胞浆，而 DNA 病毒則多见于核(表2)。

关于肿瘤病毒的来源問題，目前还没有直接証据說明它們是天然寄生的或是內源产生的。用一种正常的小鼠器官提取液可以在別种小鼠身上誘发肿瘤^[26]；以可的松(cortisone)处理正常鼠可导致肿瘤的生成^[78]；低白血病株小鼠經X綫照射引起了白血病后，可以用这种动物的无細胞过滤液将白血病传给同种其它小鼠^[27]等生物学实验，說明体内很可能有潜在形式的病毒。肿瘤病毒引起細胞恶性变的机制，由于工作做得很少，还没有得出結論。从噬菌体进入易感的細菌可以引起宿主遗传构型的改变和从細菌 DNA 转变因子实验結果看，染色体的組成部分有可能从一个細胞传入另一个細胞而发生作用。换言之，无论是細胞本身遗传物质內部的改变或是外界的病毒的侵入，这些新的遗传因素，都有可能通过不同的途径来影响和改变細胞原有的代謝规律。有人推論认为新引入的病毒可以作为一种稳定的独立自主的模板，主宰着新的代謝体系的形成，从而使細胞調节机制发生了根本的变化^[43]。Rogers^[91]在 Shope 乳头状瘤病毒感染过程中观察到細胞内出现了一种特异的精氨酸酶，Haddad 等^[28]报告細胞内髓母細胞增生症病毒繁殖区有和病毒密切相关的三磷酸腺苷酶的合成，都支持这种看法。此外，Zilber^[79]根据 Shope 病毒感染家兔、多发肿瘤病毒感染地鼠后不能从瘤組織再分离出原病毒(masking 现象)^[28]等事实，提出了自己的见解，他认为病毒并非

在癌变过程中自始至终都参与作用。一个正常細胞演化成肿瘤細胞是由于在原細胞的遗传結構上参入了外来的遗传信息的結果，因此是杂交 (hybridization)，而不是变异。按照这种想法，他提出今后肿瘤的治疗应该考虑这种遗传信息的参入是否可逆的問題，和如何除去它的問題。

由上述可见深入研究肿瘤病毒的作用机制尤其是和宿主的相互关系，对闡明肿瘤发生机制有着重大意义。由于烟草花斑病毒 RNA 和肺炎球菌等 DNA 轉变因素工作的启发，从肿瘤病毒或由其产生的肿瘤組織中分离有致癌活性的核酸，已取得若干成果^[8,12,13,24,29,31,36,37,40,41,45,46,52,69]。

多发肿瘤(polyoma)病毒可以感染不同种的鼠类(小白鼠、大白鼠、地鼠、豚鼠)，在同一动物体可以引起多种組織发生恶性变(可达 23 种之多)^[71]。这种病毒具有传染性^[63,64]，因此和一般传染病病毒的界限不易划分；由于它只含 DNA^[68]，在这一方面和噬菌体化学組成相似，另一方面，其作用和細菌中所见 DNA 轉变因素的作用又很相象，因此按照 DNA→RNA→蛋白质路綫进行核酸与肿瘤发病关系研究的十分理想的模型材料。Dimayorca 等^[12]自多发肿瘤病毒分离致癌活性 DNA 的工作，已經获得成功。他們用石炭酸分离此病毒 DNA，以之感染鼠胚的組織培养細胞，见到了和完整病毒效应一样的細胞病变，以免疫学方法証明有病毒繁殖，以受染細胞的組織培养液上清部分接种动物，可引起多发肿瘤。

Ito^[40,41] 从 Shope 乳头状瘤組織提取活性 DNA 也获得了肯定的結果。

可以想象，致癌活性核酸的更为广泛的証实，将如烟草花斑病毒致病的 RNA 对病毒学发展所起的促进作用一样，是肿瘤病因学說中一个重大事件，它不仅为肿瘤病因学說提供了有力的支持，而且也為今后直接从分子水平探索細胞恶性变的机制找到了极为重要的研究途径，对了解正常細胞的分化机制也将会产生很大影响。

目前由于在相当多的肿瘤組織中还没有找到病毒，因此尚不

能肯定所有的肿瘤都是由病毒引起的；另一方面由于从发现已有50年历史的 Rous 肉瘤病毒还没有成功地证明核酸的活性，所以也不应认为核酸是不需要其他条件参与作用的唯一的致癌因素。这都说明恶性变是一个十分复杂的问题，找到核酸的作用这一环节当然是一项重大的进步，但是距离全面深刻地阐明肿瘤发生机制还有一个相当大的距离，走完这段路程，无疑需要作更多的更艰巨的势力。

五、結 束 語

本文以核酸的生物学性质和遗传信息传递学说为引綫，概括地介绍了目前肿瘤病因学的理论研究的一些情况和趋势。文中虽然突出地综合了核酸各方面的资料，但这里应该声明，肿瘤的发生和发展决不仅仅是核酸和蛋白质的失常问题。多细胞生物体的肿瘤细胞和病毒细菌等微生物间，虽有其肯定的生物学基本共性，但也存在极大的差别。前者不仅细胞的结构十分复杂，而且功能也更为微妙。一个细胞里面各个代谢系统互相制约关系的改变，细胞内外环境相互统一关系的破坏，都是肿瘤发生的重要条件，因此，也都不容忽视。

参 考 文 献

- [1] Allfrey, V. G., Vth Intern. Cong. Biochem. Moscow, Symp. No. 2, Preprint No. 140, 1961.
- [2] Amano, M. & C. P. LeBlond, Exptl. Cell Research, 20:250, 1960.
- [3] Anderer, F. A., H. Uhlig, E. Weber & G. Schramm, Nature, 186:922, 1960.
- [4] Avery, O. T., C. M. McLeod & M. J. McCarty, J. Exptl. Med., 79:137, 1944.
- [5] Beard, J. W., Cancer Res., 16:279, 1956.
- [6] Bielka, H. & A. Graffi, Acta Biol. Med. Germ., 3:515, 1959.
- [7] Biovin, A., A. Delaunay, R. Vendrely & Y. Lehault, Experientia 1:334, 1945.
- [8] Black, L. M., Ann. N. Y. Acad. Sci., 54:1067, 1952.
- [9] Brachet, J., Arch. Biol. (Iege), 53:207, 1942.

- [10] Caspersson, T., *Naturwissenschaften*, **29**:33, 1941.
- [11] De Carvalho, S. & H. J. Rand, *Nature*, **189**:815, 1961.
- [12] Dimayorca, G. A., B. E. Eddy, S. E. Stewart, W. S. Hunter, C. Friend & A. Bendich, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **45**:1805, 1959.
- [13] Dixon, G. J., B. A. Dunean & F. M. Schabel, *Fed. Proc.*, **20**:155, 1961.
- [14] Dmochowski, L., *Science*, **133**:551, 1961.
- [15] Ephrussi-Taylor, H., "A Symposium on the Chemical Basis of Heredity" p. 299, The Johns Hopkins Press, 1957.
- [16] Fraenkel-Conrat, H., *ibid.*, p. 501.
- [17] Fraenkel-Conrat, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**:882, 1956.
- [18] Furth, J. & D. Metcalf, *J. Chronic Dis.*, **8**:89, 1958.
- [19] Gorgiev, G. P. & V. L. Mantyeva, *Vth Intern. Cong. Biochem. Moscow*, p. 111, 1962.
- [20] Gierer, A. & G. Schramm, *Nature*, **177**:702, 1956; *Zeit. Naturforsch.*, **116**: 138, 1956.
- [21] Gierer, A. & R. W. Mundry, *Nature*, **182**:1457, 1958.
- [22] Goldthwait, D. A., *Am. J. Med.*, **29**:1934, 1960.
- [23] Goodgal, S. H. & R. M. Harriott, "A Symposium on the Chemical Basis of Heredity", p. 336, The Johns Hopkins Press, 1957.
- [24] Graffi, A. & D. Fritz, *Naturwissenschaften*, **45**:320, 1958.
- [25] Griffin, A. C. & M. A. O'Neal, *VIIIth Intern. Cong. Cancer, Moscow*, p. 111, 1962.
- [26] Gross, L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.* **88**:362, 1955.
- [27] Gross, L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, **100**:102, 1959.
- [28] Haddad, M. N., D. Weinstein, R. A. Bonar, G. S. Beaudreau, C. Becker, D. Beard & J. W. Beard, *J. Nat. Cancer Inst.*, **24**:971, 1961.
- [29] Harel, J., J. Huppert, F. Lacour & J. Lacour, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **247**:795, 1958.
- [30] Harris, S. H., *Vth Intern. Cong. Biochem. Moscow, Symp. No. 2. Preprint No. 78*, 1961.
- [31] Hay, E. F., N. S. Simmons & W. S. Beck, *Nature*, **180**:1419, 1957.
- [32] Hershey, A. D. & M. Chase, *J. Gen. Physiol.*, **36**:39, 1952.
- [33] Hoagland, M. B., "The Nucleic Acids", vol. 3. p. 349, 1960.
- [34] Hotchkiss, R. D., "A Symposium on the Chemical Basis of Heredity" p. 321, The Johns Hopkins Press, 1957.
- [35] Hotta, Y. & S. Osawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **28**:642, 1958.
- [36] Huppert, J. & F. Lacour, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **248**:1950, 1955.
- [37] Huppert, J. F. Lacour & J. Lacour, *ibid.*, **252**:1876, 1961.
- [38] Huxley, J., "Biological Aspects of Cancer" p. 18, Unwin Brothers.

- [39] Ingram, V. M., *Brit. Med. Bull.*, **15**:27, 1959.
- [40] Ito, Y., *Virol.*, **12**:596, 1960.
- [41] Ito, Y. & C. A. Evens, *J. Expt. Med.*, **114**:485, 1961.
- [42] Jacob, F. & J. Monod, *J. Mol. Biol.*, **3**:318, 1961.
- [43] Kaplan, H. S., *Fed. Proc.* **21**:1, 1961.
- [44] Khesin, R. B., Vth Intern. Cong. Biochem. Moscow, Symp. No. 2. Preprint No. 7, 1961.
- [45] Lacour, F., J. Lacour, J. Harel & J. Huppert, *J. Nat. Cancer Inst.*, **24**:301, 1960.
- [46] Latarjet, R., N. Rebeyrotte & E. Moustacchi, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **246**:853, 1958.
- [47] Lengyel, P., J. F. Speyer & S. Ochoa, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **47**:1936, 1961.
- [48] Lengyel, P., J. F. Speter, C. Basilio & S. Ochoa, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**:262, 1962.
- [49] Litman, R. M. & A. B. Pardee, *Nature*, **178**:529, 1956.
- [50] Martin, E. M. & T. S. Work, Vth Intern Cong. Biochem. Moscow, Symp. No. 2. Preprint No. 179, 1961.
- [51] Martin, R. G., J. H. Matthlei, O. W. Jones, & M. W. Nirenberg, *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **6**:410, 1961~1962.
- [52] Meek, E. S. & T. F. Hewer, *Brit. J. Cancer*, **13**:121, 1959.
- [53] Miller, E. C. & J. A. Miller, *Cancer Res.*, **12**:547, 1952.
- [54] Nitenberg, M. W. & J. H. Mathlei, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **47**:1588, 1961.
- [55] Nirenberg, M. W. & J. H. Matthlei, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **48**:104, 1962.
- [56] Niu, M. C., C. C. Cordova & L. C. Niu, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **47**:1689, 1961.
- [57] Niu, M. C., VIIIth Intern. Cong. Cancer, Moscow, p. 110, 1962.
- [58] Oppennoorth, W. F. F., *Nature*, **193**:706, 1962.
- [59] Osawa, S., K. Takata & Y. Hotta, *Biochim. Biophys. Acta*, **28**:271, 1958.
- [60] Perry, R. P., *Exptl. Cell Res.*, **20**:216, 1960.
- [61] Rogers, R., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **3**:262, 1961.
- [62] Rous, P., *J. Exptl. Med.*, **12**:696, 1910.
- [63] Rowe, W. P., *Bact. Rev.*, **24**:18, 1961.
- [64] Sachs, L. & E. Heller, *Brit. J. Cancer*, **13**:452, 1959.
- [65] Schaltissek, C., *Nature*, **194**:353, 1962.
- [66] Sibatani, A., S. R. de Kloet, S. R. Allfrey & A. E. Mirsky, *Proc. Nat.*

Acad. Sci. U. S., 48:471, 1962.

- [67] Sinsheimer, R. L., "The Nucleic Acids" vol. 3, p. 187, 1960.
- [68] Smith, J. D., G. Freeman, M. Vogt & R. Dulbecco, Virol. 12:185, 1960.
- [69] Smith, M. H. D., Ann. N. Y. Acad. Sci., 54:1141, 1952.
- [70] Speyer, J. F., P. Lengyel, C. Basilio & S. Ochoa, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 48:63, 1962.
- [71] Speyer, J. F., P. Lengyel, C. Basilio & S. Ochoa, ibid., 48:441, 1962.
- [72] Stewart, S. E. & B. E. Eddy, Adv. Virus Res., 7:61, 1960.
- [73] Twugita, A., D. T. Gish, J. Young, H. Fraenkel-Conrat, A. Knight, & W. M. Stanley, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 46:1463, 1960.
- [74] Vendrely, R., "The Nucleic Acid" vol. 2, p. 155, 1955.
- [75] Warburg, O., Science, 123:309, 1956.
- [76] Webster, G. & S. L. Whitman, Vth Intern. Cong. Biochem. Moscow, Symp. No. 2, Preprint No. 113, 1961.
- [77] Weisberger, A. S., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 48:68, 1962.
- [78] Wooley, G. W. & M. C. Small, Ann. N. Y. Acad. Sci., 68:553, 1957.
- [79] Zilber, L. A., J. Nat. Cancer Inst., 26:1311, 1961.

第十二讲 电离辐射对核酸 代謝的影响(一)

陆如山

中国医学科学院

一、引言

近二十年来, 电离辐射对核酸代謝影响的研究有了蓬勃的开展。因为, 进一步掌握电离辐射对核酸代謝影响的规律不仅对阐明辐射损伤的发生机制有着重要意义, 并将为探討辐射所导致的遗传变异、細胞分裂失常以及染色体破坏等问题的本质提供重要的依据。尤其是在最近十年内, 由于新技术的应用(如同位素示踪法、放射自摄影术、細胞分光光度法等)和选用了适当的实验材料, 使这一领域中的研究在现代生物化学成就的基础上有了很大程度的进展。有关这方面工作的一些綜述是值得参考的^[1, 8, 12, 33, 47, 56, 66, 108]。本文就电离辐射对脱氧核糖核酸(DNA)代謝, 主要是合成代謝影响的某些有关问题作一簡要的介绍。

二、电离辐射对脱氧核糖核酸代謝的影响

(一) 电离辐射对标记前体并合到脱氧核糖核酸中的影响

在电离辐射对核酸代謝影响的研究中以标记前体并合作用的工作进行得最多。一般认为, 电离辐射对DNA合成的影响大于RNA^[78]。在照射后各种组织中 DNA 前体并合量下降的同时, DNA 含量也随着减少^[13, 78]。早在1942年 Hevesy 等人首先証明 1000r X 綫全身照射使 P^{32} -磷酸盐并合到大鼠肿瘤細胞 DNA (Jensen 肉瘤) 的速度明显减慢^[82, 83]。其后許多学者利用了各种标记前

体,如 P^{32} 、 C^{14} -甲酸、醋酸、乳清酸、腺嘌呤及合成 DNA 专一性很高的 C^{14} -、 H^3 -胸腺嘧啶核苷等,在不同的动物组织(正常与肿瘤组织)或离体的细胞培养中进行过大量的观察。表 1, 2 是照射

表 1 电离辐射对标记前体并合到正常组织中 DNA 的影响

组织	动物	照射剂量	标 记 物	照后观察时间	抑制程度	参考文献	备注
小	兔	800 r	C^{14} -甘氨酸	5 小时	>70%	Abrams, 1951 [9]	
	小鼠	800 r	4, 6- C^{14} -腺嘌呤	1~3 小时	60%	Bennett 等, 1954 [14]	
	小鼠	300 r 800 r 2500 r	P^{32}	2~6 小时	30% 50% 60%	Kelly 等, 1955 [58]	
	大鼠	2000 r	N^{15} -甘氨酸	5 小时	50%	Toal 等, 1958 [110]	
肠	大鼠	50 r 100 r 200 r 400 r 800 r	C^{14} -胸腺嘧啶核苷	4 小时	~38% ~43% ~48% ~55% ~80%	Nygaard 等, 1959 [80]	经折 算成 百分 数
	小鼠	3000 r	H^3 -胸腺嘧啶核苷	15 分钟	~50%	Sherman 等, 1958 [104]	
胸	大鼠	800 r	P^{32}	3 小时	~50%	Thomson 等, 1952 [109]	
	大鼠	100 r	C^{14} -甲酸钠 2- C^{14} -乳清酸 P^{32} 8- C^{14} -腺嘌呤	24 小时	48% ~70% 47~65%	Harrington, Lavik, 1955 [42]	
	大鼠	100 r	P^{32}	2~3 小时	50~70%	Kelly 等, 1956 [57]	
	大鼠	1000 r	2- C^{14} -甘氨酸	2 小时	~60%	Richmond 等, 1957 [102]	
腺	大鼠	1000 r	P^{32}	3 分钟	~50%	Ord, Stoc-ken, 1957 [88]	
	大鼠	400~800 r	2- C^{14} -胸腺嘧啶核苷	4 小时	~50%	Nygaard 等, 1959 [80]	
	兔	800 r	C^{14} -甘氨酸	5 小时	~70%	Abrams, 1951 [9]	
骨	小鼠	800 r	C^{14} -腺嘌呤	1~3 小时	~50%	Bennett 等, 1954 [14]	
	兔	1000 r	P^{32}	2 小时	~40%	Smellie 等, 1955 [105]	
	兔	300 r	P^{32}	2 小时	~40%	Kelly 等, 1955 [58]	
	大鼠	600 r	H^3 -胸腺嘧啶核苷	3 小时	~40%	Tsuya 等, 1961 [111]	

(續表)

組織	动物	照射剂量	标 記 物	照后观察時間	抑制程度	参考文献	备注
毛囊細胞	小鼠	800~3000 rad	H ³ - 胸腺嘧啶核苷	20 分钟	显著抑制	Cattaneo 等, 1959 [223]	
闌尾	兔	1000 r	P ³²	3 小时	~50%	Quastler, 1956 [101]	
脾	小鼠	800 r	4, 6-C ¹⁴ - 腺嘌呤	1~3小时	60%	Bennett 等, 1954 [14]	
	大鼠	1000 r	P ³²	2 小时	60%	Ord 等, 1956 [87]	
	小鼠	100 r	P ³²	2~3小时	~50%	Kelly 等, 1956 [57]	
	小鼠	900 r	P ³²	2 小时	~60%	Hagen, 1958 [40]	
	大鼠	50 r	C ¹⁴ - 胸腺嘧啶核苷	4 小时	~22%	Nygaard 等, 1959 [80]	經折 算成 百分 数
		100 r			~38%		
		200 r			~70%		
		400 r			~80%		
		800 r			~90%		
睪丸	小鼠	800 r	4, 6-C ¹⁴ - 腺嘌呤	1~3小时	~60%	Bennett 等, 1954 [14]	
肝	小鼠	800 r	4, 6-C ¹⁴ - 腺嘌呤	1~3小时	~60%	Bennett 等, 1954 [14]	
	大鼠	300~2500 r	P ³²	2 小时	↓	Kelly 等, 1955 [58]	
	大鼠	1000 r	P ³²	2 小时	10~70%	Ord 等, 1956 [87]	
	大鼠	1000 r	P ³²	2 小时	~30%	Richmond 等, 1957 [102]	
			C ¹⁴ - 甘氨酸		—		

后短時間內測定标记物參入的一些例子。

由于实验条件不一:如照射剂量不同,观察時間不同,計算方法不同,以致对不同学者所获得的結果不易作出确切的比較。然而从表中的資料可以得出 DNA 代謝变化的一般規律;在致死剂量照射时,电离輻射抑制組織中 DNA 合成,其抑制程度通常在 50% 左右,以后如动物存活, DNA 合成則有不同程度的恢复。

表 2 电离辐射对标记前体并合到肿瘤组织中 DNA 的影响

肿瘤组织	动物	照射剂量	标记物	照射后观察时间	抑制程度	参考文献	备注
Jensen 肉瘤	大鼠	460~7000 r	P ³²	2 小时	↓	Euler 1942, 1944 [32] Hevesy [33]	
艾氏肉瘤	小鼠	1500~2000 r	P ³²	1 1/2 小时	~50%	Holmes 1949 [45]	
艾氏腹水癌	小鼠	1250 r	C ¹⁴ -甘氨酸	35~150 分	25%	Forssberg 等, 1954 [35]	
乳腺癌	小鼠	800 r	P ³²	2 小时	20%	Kelly 等, 1955 [58]	
淋巴肉瘤					50%		
艾氏多倍体	小鼠	1000~5000 r	P ³²	3 小时	40%	Harrington 等, 1957 [43, 44]	
6C3HED 淋巴肉瘤					40%		
艾氏双倍体					—		
T3 腺癌					—		

Ord 和 Stocken^[88] 以 1000 r X 线全身照射大鼠, 发现照射后三分钟 P³² 并合到胸腺 DNA 的量就下降一半, 这是一个在照后尽早进行观察的例子。

射线损伤使 DNA 合成受阻的程度可因下列条件不同而有差异。(1)照射剂量: 小于全身一次致死剂量照射时, 抑制效应随着照射剂量增加而加大。Nygaard 等人^[80] 曾以不同剂量 X 线照射大鼠(50, 100, 200, 400, 800 r), 见到 C¹⁴-胸腺嘧啶核苷并合到脾、小肠等组织 DNA 的标记量减少程度随剂量而异。(2)标记前体: 不同标记前体导致不同的实验结果。Harrington 等人^[42] 以 100r X 线照射大鼠, 其 C¹⁴-甲酸钠、C¹⁴-乳清酸、P³² 并合到胸腺 DNA 量均有下降, 但对 8-C¹⁴-腺嘌呤的并合却毫无影响。这种不同的实验结果可能与前体并合到 DNA 分子的生化机制有关。例如, 本例中甲酸钠并合到胸腺嘧啶中的途径可能受到阻滞而腺嘌呤的并合作用却不受影响。(3)组织的放射敏感性: 一般说, 在“放射敏

感”的淋巴組織(淋巴結、脾、胸腺)、骨髓、腸等組織中 DNA 合成受抑制的程度遠較“放射穩定”的肝、胰、腎中為甚。在腫瘤組織中,實質性腫瘤較腹水癌敏感。同樣是腹水癌細胞,其 DNA 合成受輻射損傷的程度也有所區別。例如 Harrington 等人曾以 1000~5000 r 照射小鼠,發現 P^{32} 并合到艾氏多倍體癌和 6C3HED 淋巴肉瘤中 DNA 有 40% 受抑制,但對艾氏雙倍體癌及 T3 腺癌的并合量沒有影響^[43,44]。(4) 組織損傷的修復程度:不同組織的輻射損傷修復程度不一,因此在照射後不同時間內進行測定就可導致不同的結論。Nygaard 等人^[80]曾報告大鼠經 50~100 r X 綫照射後 4 小時,其小腸與脾攝取 C^{14} -胸腺嘧啶核苷的速度均受抑制,但 24 小時後,小腸中的并合速度已經恢復,而脾中仍未見復原。

電離輻射抑制 DNA 合成的規律在標記前體并合到細胞核的工作中也得到了證明。Longan^[72]利用放射自攝影術發現 300 r X 綫離體照射後,家兔肝、胸腺、闌尾等組織的細胞核攝取 DNA 標記前體(H^3 -胸腺嘧啶核苷、 C^{14} -乳清酸、 C^{14} -腺嘌呤)的能力降低一半。然而,Будилова^[2]在 1000 r γ 綫離體照射大鼠胸腺細胞核的實驗中未曾觀察到類似的結果;但有趣的是以同樣劑量全身照射大鼠,就可見到 C^{14} -甲酸盐和 C^{14} -腺嘌呤并合到胸腺細胞核的量下降約 50%。

標記前體并合到 DNA 量的減少不僅受電離輻射的影響,而且也可因許多對射綫敏感的生物學過程的改變而引起。如所周知,一般只有在分裂細胞中 DNA 合成才能進行,而細胞分裂又是对射綫最敏感的細胞功能^[117],輻射抑制了細胞分裂,推遲了分裂週期,使組織中分裂與不分裂細胞間的比例有所改變,从而使組織中標記的總并合量減少,這裡並不一定反映了 DNA 合成本身受到射綫的影響(在離體細胞培養的工作中也有細胞分裂停止,但 DNA 合成繼續進行的例子^[79])。其次,在某些組織中(如腸、胸腺等)照射後細胞迅速出現死亡,儘管殘留存活細胞中 DNA 合成速度正常,但由於分離物質中也包括死亡細胞的 DNA,因此也能使

DNA 放射比活性减低。在 Howard^[50], Kelly^[56], Lajtha^[66] 的綜述里对这些問題都有詳細的討論。然而, 上述的一些因素并不能改变并合作用受电离輻射影响的总趋势, 因为射线损伤引起分裂細胞数的改变或使細胞发生死亡都需經過一定時間才出现, 如果在照射后很短時間内进行观察(照后几小时甚至几分钟)就可在很大程度上避免这些細胞数量变化的影响了。

(二) 电离輻射对脫氧核糖核酸中間代謝物含量的影响 在射线影响下組織中 DNA 代謝物有着改变的事实, 最早是由 Mitchell 氏所报告的^[75]。他在受射线治疗过的肿瘤細胞胞浆里观察到紫外吸收物质的积聚, 后者和核苷酸一类物质相似。随后, 又进一步証明在胞浆中核苷酸增加的同时, 細胞核中脫氧核苷酸的合成反而减少^[76]。Kanazir 和 Errera^[55] 在研究紫外线对大肠杆菌影响的工作中, 发现照射后 20~40 分钟細菌合成 DNA 的能力受到抑制, 而含磷酸、核糖、脫氧核糖的酸溶性物质却有所增加。經层析法鉴定, 証明酸溶性物质系脫氧核苷(鳥嘌呤、腺嘌呤、尿嘧啶)及脫氧核苷酸(胞嘧啶、胸腺嘧啶)的混合物。这些結果似乎表明了 DNA 合成途径中的早期步骤不受輻射影响。

Bishop 和 Davidson^[47] 利用了細菌測定方法发现家兔經全身 1000 r X 綫照射后, 在其闌尾及胸腺組織中有大量脫氧核苷酸和脫氧核苷积聚; 其含量升高始于照后一小时, 4 或 8 小时达最大值。根据同时間内 DNA-P 含量也有輕度上升的事实, 他們认为脫氧核糖物质的增加并非 DNA 分解产物, 可能是 DNA 合成遭到暂时性的阻滯, 而使前体有了明显的积聚。Cole 和 Ellis^[25] 以 810~850 r X 綫全身照射小鼠, 在照射后的第一小时见到脾脏能被 M/15 中性磷酸緩冲液抽提的可溶性脫氧多核苷酸就有所增加。4~6 小时的释出量达最高, 几乎为对照組含量的 10 倍。此时, 脾重量及脾中脫氧核蛋白含量也迅速下降。在骨髓中也有类似的改变, 且出现得更早, 变化更为急剧^[80]。离体实验結果表明脫氧多核苷酸在整体中有随着血液运走的可能^[24], 故而組織中实际出现量要比測定值更高。Cole 等人基于可溶性脫氧多核苷酸的

大量出现与脱氧核蛋白的含量下降在时间上有一定的平行关系的事实，认为电离辐射引起核蛋白的分解及 DNA 的解聚的可能性是存在的。

在探讨照射导致脱氧核苷酸含量改变的研究中，以 Ord 和 Stocken^[89] 的观察最为重要。他们以离子交换柱层析的方法证明了大鼠经 1000 r X 线全身照射后一小时，胸腺中各种脱氧核苷一磷酸和三磷酸都有着不同程度的积聚，其中以脱氧尿嘧啶核苷一磷酸及脱氧胞嘧啶核苷三磷酸增加最多，几乎为对照值的 3 倍以上。作者们在其实验里并未发现胸腺嘧啶核苷酸的存在。脱氧尿嘧啶核苷的磷酸盐不是 DNA 的正常组份，但可能是胸腺嘧啶核苷的前体。似乎电离辐射选择性地抑制了胸腺嘧啶核苷酸的合成，并由于这一简单的干扰使 DNA 的合成发生了障碍。关于酸溶性核苷酸的堆积在大鼠脾脏^[74]、豚鼠脾脏^[41]，也有类似的观察。

根据以上资料，照射后机体组织中 DNA 中间代谢物的含量增加是肯定的事实，其最可能的原因是机体对 DNA 中间物（合成前体）的利用能力受到严重障碍。当然也不能完全排除 DNA 和 DNP 的分解加速的可能性。

（三）电离辐射对脱氧核糖核酸中间代谢物从体内排出的影响 1958 年 Parizek 等人^[95] 报告了大鼠经 X 线照射后的第一昼夜内随尿排出的对 Dische 氏试剂呈阳性反应的脱氧核糖类物质显著增加。在 50~600 r 的照射剂量范围内，剂量与脱氧核糖类物质排出量的增加成正比。经纸层离分析证明是尿中脱氧胞嘧啶核苷含量有了增加的结果。除了射线与类放射线物质外，别的不良刺激均不能使脱氧核糖类物质的排出量增加，也非肾功能改变所致。可能是射线引起 DNA 代谢紊乱的直接结果，并认为作为射线损伤的指标可能有一定意义。

以后有不少学者从事于这方面的工作，表 3 归纳了有关的资料。

表 3 的资料表明，不同剂量的各种射线照射（ α -， γ -射线，快

表3 电离辐射对尿中脱氧核糖类物质含量的影响

动物	射线	照射剂量	24 小时尿样中含量			参考文献	备注
			照射前	照射后一天	照射后3或6天		
大鼠	X	300~600 r	100%	255%	恢复正常	Parizek 等, 1958 ^[5]	
	X	130~910 r	4.9 毫克	4.4~14.1 毫克	5.1~5.3 毫克		
	X	1300 r	4.9 毫克	13.8 毫克	5.3 毫克		
	γ	600~5000 r	4.6 毫克	8.2~12.2 毫克	3.5~5.3 毫克	Журанова 等, 1960 ^[4]	
大鼠	γ	20,000 r	4.6 毫克	7.8 毫克	死亡		
	快中子	84.6~507.9 rads	100%	133~196%	恢复正常	Романцев, 1961 ^[4]	
小鼠	X	550 r	100%	200%	60%		
兔	γ	1000 r	100%	52%	180%	Федорова 等, 1960 ^[8]	
	X	350 r	100%	120~176%	40~60%		
大鼠	Sr ⁹⁰	0.5 mc/公斤体重 2 mc/公斤体重	100%	74%	63%	Успенская, 1961 ^[6]	括号内百分数为脱氧胞嘧啶核苷量
	Po ²¹⁰	0.05 mc/公斤体重 0.1 mc/公斤体重	100%	~90% (137%) ~90% (137%)	~100% (127%) ~119% (152%)	Успенская, 1962 ^[7]	同上

中子, Sr^{90} , Po^{210} 內照射) 对各类实验动物的效应基本上是一致的。在大多数情况下, 放射损伤后的 24 小时内均可见到脱氧核糖类物质随尿排出量的增加 (虽然在家兔经 γ 綫照射的例子里含量升高出现在照后第六天)。小剂量的 Sr^{90} (0.5 毫居里/公斤体重) 引起排出量的降低, 大剂量 (2 毫居里/公斤体重) 导致脱氧胞嘧啶核苷含量增高的原因, 尚无完善的解说。

放射损伤后脱氧胞嘧啶核苷随尿排出量增加的机制问题也曾有过初步探讨。Parizek 等人^[96] 曾以 4 种不同的脱氧核苷 (腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶的脱氧核苷) 分别注射给动物。发现脱氧胞嘧啶核苷在注射后数小时几乎全部以原形随尿排出, 其余三种核苷均经其他代谢途径排出。可见, 机体经照射后不能利用脱氧核苷而使它们在组织中有大量的积聚, 过量的脱氧胞嘧啶核苷不经转变而以原形随尿排出。至于照射后第二昼夜开始尿中对 Dische 反应呈阳性的物质不仅没有增加, 反而有所下降的原因是值得进一步探索的问题。

(四) 电离辐射对脱氧核糖核酸酶的影响 辐射损伤引起“放射敏感”组织中 (如大鼠脾、小鼠胸腺、骨髓) DNA 酶 II (即酸性 DNA 酶, 最适 pH 5.5) 活力升高^[84, 63, 65, 82]。这一变化在照后 6 或 12 小时出现, 24 或 48 小时达最高峰^[84]; 24 小时内酶的比活性增加与照射剂量成正比。骨髓组织中酶活力只在照后 7 天才上升。小鼠经全身 160 r 照射 24 小时后, 每个胸腺细胞的酶活力增多 5 倍^[115], 780 r 照射后的第二昼夜几乎为正常值的 20 倍。在照后第 2 或第 3 天脾和胸腺中的酶活力开始下降^[65]。肝内 DNA 酶 II 的活化不明显, 500 r 照射对大鼠肝中酶活力并无影响^[84], 700 r 照射小鼠四天后肝酶活力才出现轻微升高^[65]。

Kowlessar 等人^[61, 62] 指出大鼠受照射后 18 小时, 血清 DNA 酶 I (即中性或碱性 DNA 酶) 及 DNA 酶 II 活力分别增加 2 及 12 倍, 尿中活力为正常值的 3 倍。关于血、尿中 DNA 酶增高的来源也曾有过探讨, Jovanovic^[54] 观察到动物经切除脾脏后, 不经照射, 血清、尿、骨髓中 DNA 酶活力也有所增加, 与射线损伤所致的

效应相同。Kurnick 等人^[99] 以 800 r X 綫直接照射小鼠脾脏，未发现脾 DNA 酶活力升高；相反，如保护脾脏照射全身，则 DNA 酶活力升高。这些结果都表明了血、尿中酶活力的增多并非来自脾脏，而可能与含 DNA 酶較多的肠粘膜损伤有关^[10]。

許多学者认为在細胞中或在含完整細胞顆粒的匀浆中大部分 DNA 酶 II 存在于細胞顆粒中而不与其底物相接触。照射后結合状态的 DNA 酶获得释放而活化，可能是酶活力增高的主要原因。Roth 等人^[109] 曾报导过 700 r X 綫照射大鼠，使核糖核酸酶 (RNA 酶) 在肝細胞器中的分布有所改变，即細胞核、綫粒体及微粒体中的 RNA 酶都向上清部分轉移。DNA 酶也具有这种变化的可能性是存在的^[89]。Okada 等人^[82~86] 以 $10^4 \sim 10^6$ r 的 X 或 Co^{60} γ -綫离体照射肝綫粒体混悬液的实验中，当电子显微镜观察表明肝細胞器结构出现变化时，与細胞器相連的 DNA 酶的活力也有了上升（可能与綫粒体的内膜和外膜相連），他們认为虽然在上述情况中酶尚未释出，但顆粒的微細破坏已使酶和底物間的接触机会增加而导致酶活力的升高。随后，他們以 0.44 M 蔗糖液或蒸餾水分別制得脾匀浆^[86]，发现保留細胞器完整的蔗糖液匀浆中 DNA 酶活力較使細胞结构遭到破坏的水匀浆低 3 倍。如果脾脏事前經 X 綫照射，二种匀浆中的酶活力便相差无几。这些材料都表明了細胞器破坏后酶的释放是照射引起 DNA 酶活力增加的主要原因。此外，整体受照时，水匀浆中 DNA 酶活力与对照值比較也有所增加似說明酶合成速度加快的可能性也是存在的。

由于人們对于 DNA 酶 II 的正常生理作用缺乏了解，因此就很难对电离輻射引起酶活力增加的意义作出判断。近来文献中出现了一些报导，认为 DNA 酶除了具有水解作用外，还有別的功能。例如 Goutier 等人^[87] 在大鼠再生肝，Brody 等人^[20, 21] 在生长組織中发现 DNA 酶活力有着显著的增加。Chevrement 等人^[28] 的研究最有兴趣，他們发现离体纖維母細胞經純 DNA 酶 II 处理后，其細胞綫粒体摄取 H^3 -胸腺嘧啶核苷的能力以及 Feulgen 阳性物质的合成俱有增加。可见在 DNA 合成中 DNA 酶的

作用尚不能完全除外。

但值得注意的是在大多数情况下,机体經照射后几小时 DNA 酶活力才有所增高,似非机体损伤的早期现象,而在这一段較长时间内更为重要的核苷酸磷酸化及 DNA 合成过程的破坏早就出现。其次, DNA 酶活力升高也非是机体对輻射损伤的特异性的反应,因为别的可以破坏細胞的各种因素,如超声波处理、内分泌影响^[28, 84] 都能导致酶活力的改变。

三、細胞分裂周期中电离輻射对脫氧核糖核酸合成的影响

(一) 离体細胞培养 自 1953 年 Howard 和 Pelc 在植物細胞实验中发现 DNA 合成和細胞分裂的暂时性的关系,以及在細胞分裂周期中 DNA 合成的放射敏感性不同后^[51, 98], 已經在某些类型的动物細胞进行过类似的观察^[15, 49, 68, 97]。一般认为 DNA 合成是在細胞分裂的中間期进行。在許多类型的細胞中分裂是发生在 D 期(細胞分裂期), 接着就进入了 G₁ 期(合成前期), 那时 DNA 含量是稳定的, 过了 G₁ 期 DNA 含量因合成而加倍, 这个时期称为 S 期(DNA 合成期)。在 S 期与下一个 D 期中間存在着“平靜”的 G₂ 期(合成后期)。

不同类型細胞的上述各个时期长短不一。如图 1 所示: G₁ 期的长短可从 0 (小鼠艾氏腹水癌細胞)^[49] 到 20 小时以上(人骨髓細胞)^[67]; S 期从 6 小时(豆根)^[51] 到 12 小时(人骨髓細胞); G₂ 期从少于 3 小时(人骨髓細胞)到 6 小时以上(HeLa S₃ 巨型細胞)^[94]; D 期从半小时(小鼠艾氏腹水癌)到几小时(豆根)。

观察細胞分裂周期中电离輻射对 DNA 合成影响最常采用的方法是放射自摄影术, 即培养細胞在照射后不同时期中(G₁, S, G₂, D 期)与放射性标记物共同保温(如 P³²、C¹⁴-甲酸盐、H³-或 C¹⁴-胸腺嘧啶核苷等), 經一定時間后取細胞样品作放射自摄影。根据摄影图谱上細胞中放射性顆粒的出现及顆粒的多少作为 DNA 合成及其合成量的估計。例如, Lajtha 等人^[70] 以 C¹⁴-甲

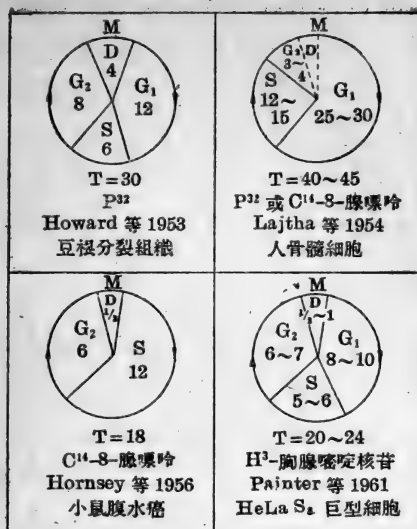


图1 DNA合成与細胞分裂关系^[50, 94]。图中数字表示时间。T=分裂周期的全部时间(小时); M=分裂中期(Metaphase)。

酸盐与人体骨髓細胞一起培养, 95% 的 C^{14} 是并合到 DNA 的腺嘧啶的甲基部分。离体培养的骨髓細胞是非同步型的, 即在任一时间里处于各个时期中的細胞都有。如在照后立即在培养物中加入示踪物, 经过 4~5 小时取出样品进行测定。同位素的并合只在 S 期中进行, 所以全部标记細胞可以代表照射时处于 S 期細胞中的 DNA 合成情况。如在照后 17~22 小时加入示踪物, 所有标记細胞便可以代表照射时处于 G₁ 期細胞, 因为 G₁ 細胞經 17~22 小时培养后已进入了 S 期, 以此类推, 就能观察在細胞分裂周期中射线对 DNA 合成的影响了。Lajtha^[68~71] 等人报告了 200~300 rad 的 X 射线照射使 40~50% 的 G₁ 細胞在一段时间内不能正常地进入 S 期, 即 DNA 合成有所推迟, 经过一段时间延缓后, G₁ 細胞仍能发展成为 S 細胞。一旦进入 S 期后, 細胞合成 DNA 的能力与正常无异。200~300 rad 的照射剂量已使 G₁ 期效应达到最大。但同样剂量的照射对于处在 S 期的細胞毫无影响,

只有大得多的剂量 (750~2000 rad) 才能使 S 細胞中 DNA 合成出现 50% 的抑制, 10,000 rad 照射使抑制程度达到 75%^[71]。

Paul^[97] 利用 H^3 -胸腺嘧啶核苷并合到离体培养的纖維母細胞的研究中, 如果在細胞开始培养时, 即当大多数細胞处于 G_1 期給予照射, 同样地观察到 DNA 合成遭到了显著的抑制^[29]。

G_1 細胞中 DNA 合成对放射损伤更为敏感的問題引起了許多学者的注意, 其中 Bollum 等人^[18] 的见解是值得重視的。他們认为在 G_1 期时, 細胞内存在着某种比 DNA 合成本身对射线更为敏感的机制, 可能与 DNA 合成所需的二个酶(胸腺嘧啶核苷激活酶及聚合酶)的形成遭到破坏有关。

(二) 再生肝 再生肝細胞分裂迅速, DNA 合成的速度很快, 因此它是研究在整体条件下照射对 DNA 合成影响的很适宜的实验材料。再生肝可由部分切除肝脏或以 CCl_4 使肝組織坏死而形成。肝脏处理方法不同, 但对射线损伤效果是一致的。在部分肝脏經外科手术切除后的 30~40 小时, 肝再生組織中 DNA 合成和細胞分裂几乎都处于同步状态(图 2)。这样就有可能在一个細胞分裂周期中的某一时期(如 G_1 , S 等期)内观察射线损伤对 DNA 合成的影响了^[21]。細胞中 DNA 合成在手术后 18~30 小时内进行, 在 24 小时达最高峰。細胞分裂稍迟于 DNA 合成, 分裂指数在 30 小时为最大。

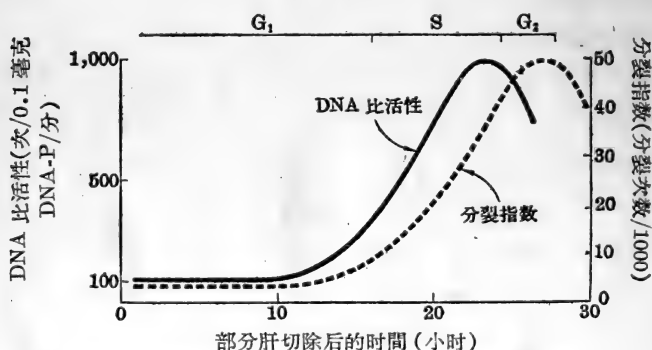


图 2 再生肝中 DNA 合成与細胞分裂簡图^[48, 66]

Holmes, Kelly 等實驗室的工作提供了許多重要的資料。Holmes 等^[46]以 P^{32} 并合到大鼠再生肝 DNA 為指標,发现在肝脏手术后 10~12 小时 (G_1 期) 給以較小劑量 (150~450 r) 的照射,使 DNA 合成和細胞分裂推迟了約 10 小时。手术后 20 小时 (S 期) 給以同样劑量照射,对 DNA 合成并无影响,但細胞分裂有了抑制。当 DNA 合成一旦开始后,就需要較大劑量 (1000~2000 r) 才能产生抑制效应^[46, 48, 53]。在 S 期內 2200 r 引起 50% 的合成抑制。Beltz 等人^[13]利用 C^{14} -乳清酸也获得了相似的结果,他們见到在 G_1 期給以 375 r 中等劑量的全身 X 綫照射使并合到再生肝 DNA 的标记量下降,1500 r 引起 DNA 合成完全停止。然而只要合成已經开始(S 期),則 1500 r 照射不具有明显的效应。

Kelly 等人^[53]以 CCl_4 致毒小鼠形成再生肝。在 CCl_4 处理后的 12、72 和 96 小时(即 DNA 合成开始前的 G_1 期)800 r X 綫全身照射引起 DNA 合成推迟;但在致毒后 24 小时和 48 小时(DNA 合成正在进行的 S 期)2000 r 照射几乎沒有影响。

因此,不論是离体細胞培养或从整体再生肝的實驗資料都进一步确定了电离輻射抑制 DNA 合成的事实,主要表现在受照射細胞中 DNA 合成有了推迟。在細胞分裂周期中 DNA 合成受射线影响是有区别的,从标记前体并合作用看来,对射线最敏感是在中間期的前半,即在 DNA 合成开始前的 G_1 期。当 DNA 合成已經开始(S 期),就需要大得多的劑量照射才能引起合成的阻滯。

目前已有許多資料^[29, 107]証明細胞分裂对射线的敏感性超过 DNA 合成。在人工培养細胞的工作里尤为明显。可能細胞分裂受阻是 DNA 合成抑制的原因。例如 Dickson 等人^[29]以 800 r 照射人工培养的小鼠纖維母細胞,使細胞分裂停止,細胞內 DNA 量繼續增加,也未見 C^{14} -甲酸盐并合到照射細胞 DNA 中的速度改变。当照射劑量增至 2300 r, C^{14} -甲酸盐和 H^3 -胸腺嘧啶核苷并合到 DNA 中是受到 50% 的抑制。然而經過 $1\frac{1}{2}$ 小时后,虽然細胞分裂不再出现,而标记前体的并合速度却有了恢复,直到細

胞中 DNA 量增加至一倍为止。Nias^[79] 等人也发现人工培养的小鼠纖維母細胞經 1000~2000 r 照射所形成的巨型細胞虽不死亡,但也不再分裂,此时 DNA 合成繼續进行,以致細胞中 DNA 含量較正常細胞多达 30 倍。

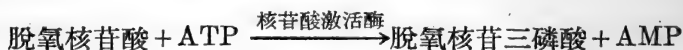
四、电离輻射抑制脫氧核糖核酸合成的可能机制

DNA 合成是在細胞核中进行的,需要許多酶系和中間物的参預,并要求一定形式的能量供应以及核內大分子 DNA 引物的存在。在这样复杂过程中的任何一个环节遭到損伤都会导致 DNA 合成的障碍。近年来,仅从照射剂量与 DNA 合成受阻程度的关系上及細胞分裂周期中所观察到的一些事实提出了推論,进行了研究,所获得的結果也需要进一步驗證的。

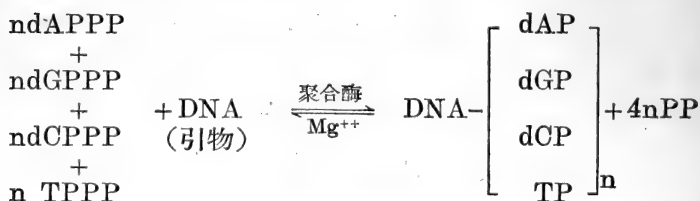
根据上面介紹的一些工作,特别是动物受射綫損伤后脫氧核苷酸、核苷在許多組織中积聚以及随尿排出的資料看来,似乎照射并不干扰 DNA 形成时所需的中間物的合成,但使脫氧核苷酸的聚合作用发生了障碍^[81, 108]。

按照 Kornberg 氏的工作^[60],在 DNA 合成过程中有着两个重要的步驟:

第一,聚合过程的准备阶段,此时脫氧核苷酸在核苷酸激活酶的作用下經磷酸化后成为脫氧核苷三磷酸。



第二,脫氧核苷三磷酸在聚合酶的作用下形成多聚体。



脫氧核苷三磷酸是具有高能磷酸鍵的分子,所以第二步反应不再需要能量供应,只要四种脫氧核苷三磷酸同时存在,少量的大

分子 DNA 作为引物 (primer) 以及镁离子的激活就能使反应进行。

不少学者认为这二步骤都可能受到射线影响。但它们的辐射敏感性有所不同。这种看法是在 1958 年由 Ord 和 Stocken, 以及 Lajtha 等同时提出来的。

Ord 和 Stocken^[91] 在放射敏感的大鼠胸腺中, 发现全身 200 r X 射线照射后 2 小时, P^{32} 并合到胸腺 DNA 抑制了 50%。当

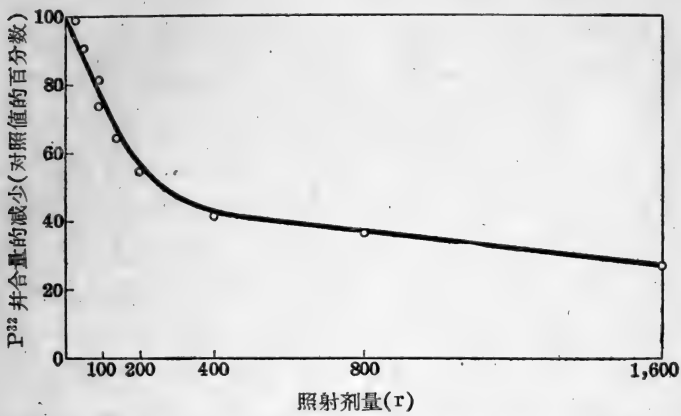


图 3 全身 X 射线照射对 P^{32} 并合到大鼠胸腺 DNA 的影响^[91]

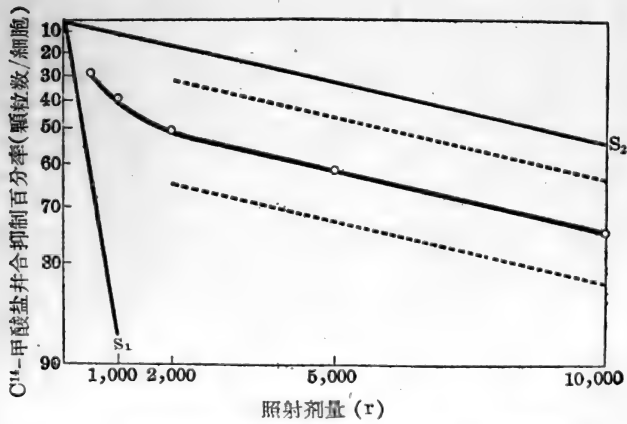


图 4 X 射线照射对人骨髓细胞合成 DNA 的影响^[71]

剂量逐渐增大时,抑制程度虽也增加,但徐緩慢多,400 r 时約为对照值的 40%,1600 r 为 25%(图3)。同样地,Lajtha 等人^[71]在放射較不敏感的人骨髓細胞离体培养中也观察到不同剂量的 X 綫照射使 C^{14} -甲酸盐并合到 DNA 中的抑制程度不同,即构成了由較低剂量照射的急剧下降的 S_1 部分和大剂量徐緩下降的 S_2 部分。在二种坡度不同的效应曲綫中 S_1 部分下降 63% 所需的剂量是 500 rad, S_2 下降至同等程度則要 13,000 rad(图 4)。

根据以上剂量与抑制效应的关系,可以設想 DNA 的合成可能有两个不同的途径;一个对射綫敏感,另一个不敏感。或者甚至可以假設存在着对放射敏感性不同的二种类型的 DNA^[41, 77]。但目前尚缺乏支持这些假設的足够事实根据。

Ord 和 Stocken 认为在剂量-反应曲綫上的低剂量效应可能与 DNA 合成准备程序,即脫氧核苷-磷酸轉变为脫氧核苷三磷酸过程受到抑制有关;而曲綫后一部分中,随着剂量加大抑制程度加深趋于緩慢似与聚合作用所必需的 DNA 引物破坏有关。Berry 等人^[15]在艾氏腹水癌細胞中获得的結論也与此相似,并发现这二种程度不同的射綫效应具有氧效应的性质。

(一) 电离辐射对磷酸化过程的影响 DNA 生物合成与氧化磷酸化有着密切的关系。Forssberg 等^[95]指出机体受照射后,合成 ATP 的量并无变化。但 Bettendorf 等^[16]以 800 r 全身照射大鼠,发现照后半小时胸腺中胸腺嘧啶核苷三磷酸含量下降到正常的 55%,而同时却未见其核苷-磷酸含量的变动,說明照射抑制了氧化磷酸化。其次細胞核利用 ATP 的能力也有所降低^[90]。Potter 等人^[100]用 C^{14} -胸腺嘧啶核苷注射大鼠的实验中,见到經 800 r X 綫照射后的一昼夜,由胸腺和脾中分离出来的胸腺嘧啶核苷的放射性很高(两个参入高峰),而胸腺嘧啶核苷酸的放射性却仍然很低。100~3200 rep 的 Co^{60} γ 綫照射后 1~7 小时使大鼠組織中 C^{14} -胸腺嘧啶核苷并合到核苷酸中的量显著下降,而并合到 DNA 的标记量更低^[99]。

Creasey 和 Stocken^[26, 27]在离体試驗中观察到以蔗糖液分

离“放射敏感”組織(胸腺、脾、淋巴結、骨髓、肠粘膜)的細胞核具有磷酸化的能力^[98]。但“放射稳定”組織(腎、肝、胰)的細胞核則不具有磷酸化能力。100 r X 綫全身照射后一小时使大鼠細胞核混悬液合成高能磷酸盐的活力完全丧失。这种现象甚至在照射后3~5分钟已能察觉。更小至25 r 照射已足以引起50~80%的抑制。作者对脾和胸腺經輻射損伤后核磷酸化能力的恢复時間也进行了研究,指出在小剂量(100 r)照射后60小时得到恢复而大剂量(1000 r)照射就不能复原。这一作用有关高能鍵的合成,其在能量代謝上的重要性是可以設想的,但究竟在电离輻射对 DNA 合成影响中的地位如何,尙有待于“結合核苷酸”和 DNA 合成間的关系闡明后才能确定。

(二) 电离輻射对脫氧核糖核酸合成酶系的影响 Ord 等^[99]报告了10,000 r X 綫照射对从大鼠胸腺制得的脫氧核苷-磷酸聚合酶不产生任何影响。在 Smellie 等人^[106]的工作中,以艾氏腹水癌的无細胞抽提液为 DNA 合成酶系,也发现500 r X 綫照射并不引起酶活力的改变。最近, Walwick 等^[114]曾在X綫照射下观察了輻射对 DNA 合成体系的影响(包括作为引物的小牛胸腺 DNA 及大鼠胸腺中的 DNA 合成酶系),认为250~10,000 rad 照射对激活酶、聚合酶及酵解酶确无影响。

然而也有不少学者在另一些实验材料里得到了不同的結論。Potter 和 Bollum 等人^[18]曾研究了电离輻射对大鼠再生肝中誘生的核苷酸激活酶的影响。发现部分切除肝脏后6小时,375 r X 綫照射使再生肝中激活酶活力显著地受到抑制。在手术后16小时进行同样剂量的照射并不使酶活力改变,甚至将照射剂量增高到1500 r 也未见有何影响。他們认为在手术后早期(6小时)小剂量X綫照射使 DNA 合成准备阶段中遭到抑制的关键性問題在于酶系形成的受阻,这也可能是 G₁ 期 DNA 合成受到抑制的一个解說,但在手术后16小时(相当于S期)这些酶系都已形成,因此較大剂量(1500 r)的照射也不引起抑制现象。至于S期中更大剂量的照射才能导致 DNA 合成受阻的原因可能与 DNA 引物受損

有关。这些結果在 Jaffe 等^[52], van Lancker 等人^[112, 113] 的工作中也获得了証实。

虽然在再生肝的实验中, 聚合酶活力也有下降, 但远不如核苷酸激活酶对射线敏感。根据 Potter 的意见, 核苷酸激活酶活力的大小是再生肝中 DNA 合成的限制因子^[18]。

关于激活酶受抑制的事实在另一些组织中也有观察。Van Lancker 等^[112] 报告了 350~700 r X 射线全身照射已足使小鼠胸腺中酶活力下降 75~80%。最近 Main 等人^[73a] 发现 850 r X 射线照射迅速地使肾中 DNA 合成酶系的活力丧失大半。至于这一变化是否是别的组织中所共有的特征, 尚需作进一步研究。

(三) 电离辐射对脱氧核糖核酸合成引物的影响 Wheeler 和 Okada 等^[116] 以 X 射线直接照射过的小牛胸腺 DNA 作为引物, 在正常再生肝 DNA 合成酶系的作用下, 观察了 H^3 -胸腺嘧啶核苷或 H^3 -胸腺嘧啶核苷酸并合到 DNA 的速度, 结果表明 $5 \times 10^4 \sim 35 \times 10^4$ r 的照射剂量使 DNA 合成速度有着相应的降低以致完全丧失。

Stacey^[107] 利用小牛胸腺的 DNA 合成酶系作了类似的观察, 发现 $9.4 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4$ r 照射过的小牛胸腺 DNA 引物接受 dCMP 和 dTMP 的能力有了很大程度的下降。

考虑到直接照射 DNA 引物溶液与整体进行照射的条件相差很远, 因此有必要在接近于生理环境中观察 DNA 引物对射线的敏感性。Okada 等人^[116] 利用了小牛胸腺细胞核作为 DNA 引物进行照射, 见到即使将照射剂量增大到 24×10^4 r 也不引起细胞核中 DNA 引物的破坏。

以上材料表明大分子 DNA 引物的完整性可能遭到射线的破坏, 但所用的照射剂量却已远远超过了一般引起 DNA 代谢紊乱的剂量。其次, 照射细胞核并不导致 DNA 引物受损。因此, 尚不能确定生活机体中 DNA 合成抑制与引物破坏间的直接关系。然而 Кузин 等^[6] 早就证明 700 r 全身照射已使大鼠脾中 DNA 迅速开始解聚, 十几小时以后结构粘度已完全丧失。Ord 和 Stocken^[92]

应用纖維素离子交換法証明,大白鼠照射1000 r 后 15 分钟,从其胸腺中分离出来的 DNA 大分子在性状上就出现明显的改变。这种 DNA 結構性状的微細改变引起 DNA 合成失常的可能性是存在的。

五、結 束 語

如上所述,电离輻射引起 DNA 代謝紊乱及其合成抑制的现象已为許多資料所証明。DNA 合成受阻主要是由于射綫损伤的細胞中 DNA 合成有了推迟;在較大剂量照射时, DNA 合成本身也能直接受到抑制。近年来,虽对 DNA 合成抑制的机制进行了不断的探索,有了进一步的了解,但照射后究竟那一个环节混乱是 DNA 合成发生障碍的主要原因尚不了解。就合成过程中可能受损的环节看来,有理由相信大分子 DNA 引物的完整性破坏及核苷酸磷酸化作用失常而导致 DNA 合成障碍的可能性較大。如果要对这些問題作出肯定的結論还需要更多的实验依据。此外当整体受輻射损伤后,体内某些因素(如:內环境的离子浓度^[81]、激素水平^[36]等)的改变也引起 DNA 合成的下降。因此,在进一步闡明 DNA 合成抑制机制中,这些因素的变化意义是非常值得注意的。

参 考 文 献

- [1] 张友端,科学通报,1961,6月号,第15頁。
- [2] Будилова, Е. В., Радиобиология, 2: 32, 1962.
- [3] Демин, Н. Н., Мед. Радиол., 5: 8, 63, 1960.
- [4] Журанова, З. И. и Романцев, Е. Ф., Мед. Радиол., 5: 3, 39, 1960; Романцев, Е. Ф., Радиобиология, 1: 508, 1961.
- [5] Кузин, А. М. и Будилова, Е. В., ДАН, 98: 961, 1954.
- [6] Успенская, С. М., Радиобиология, 1: 663, 1961.
- [7] Успенская, С. М., Радиобиология, 2: 418, 1962.
- [8] Федорова, Т. А., Успенская, М. С., Василейский, С. С. и Беляева, Е. И., Мед. Радиол., 5: 10, 42, 1960.
- [9] Abrams, R., Arch. Biochem., 30: 90, 1951.

- [10] Allfrey, V. R., Mirsky, A. E. and Stern, H., *Adv. Enzymology*, **16**: 411, 1955.
- [11] Appleqvist, L. A. and Clemetsen, G. J., *Abst. IV Cong. Biochem.*, 12~61, 1958.
- [12] Bacq, Z. M. and Alexander, P., *Fundamentals of Radiobiology*, 2nd. edition, Pergamon Press, London, 1961.
- [13] Beltz, R. E., van Lancker, J. and Potter, V. A., *Cancer Res.*, **17**: 688, 1957.
- [14] Bennett, E. L., Kelly, L. and Krueckel, B., *Fed. Proc.*, **13**: 181, 1954.
- [15] Berry, R. J., Hell, E. and Lajtha, L. G., *Nature*, **186**: 563, 1960; *Int. J. Rad. Biol.*, **4**: 61, 1961.
- [16] Bettendorf, G., Maass, H., Kirsten, E., und Künkel, H. A., *Strahlen-therapie*, **112**: 74, 1961.
- [17] Bishop, C. W. and Davidson, J. N., *Brit. J. Radiol.*, **30**: 367, 1957.
- [18] Bollum, F. H., Anderegg, J. W., McEly, A. B. and Potter, V. R., *Cancer Res.*, **20**: 138, 1961.
- [19] Brody, S. and Balis, E. M., *Cancer Res.*, **19**: 538, 1959.
- [20] Brody, S. and Thorell, B., *Biochim. Biophys. Acta*, **25**: 579, 1957.
- [21] Cater, E. B., Holmes, B. E. and Mee, L. K., *Acta Radiologica*, **46**: 655, 1956.
- [22] Cattaneo, S. M., Quastler, H. and Sherman, F. G., *Rad. Res.*, **11**: 437, 1959.
- [23] Chevremont, M., Chevremont-Comhaire, S. and Baekeland, E., *Arch. Biol., Paris*, **70**: 811, 1959.
- [24] Cole, L. J. and Ellis, M. E., *Fed. Proc.*, **15**: 411, 1956.
- [25] Cole, L. J. and Ellis, M. E., *Rad. Res.*, **7**: 508, 1957.
- [26] Creasey, W. A. and Stocken, L. A., *Biochem. J.*, **69**: 17 P, 1958.
- [27] Creasey, W. A. and Stocken, L. A., *Biochem. J.*, **72**: 519, 1959.
- [28] Csich, G., Marosvari, I. and Harmath, A., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **14**: 115, 1958.
- [29] Dickson, M. S. H. and Paul, J., *Int. J. Rad. Biol.*, **3**: 419, 1961.
Dickson, M. S. H., Paul, J. and Davidson, J. N., *Biochem. J.*, **70**: 18p, 1958.
- [30] Ellis, M. E. and Cole, L. J., *Fed. Proc.*, **17**: 366, 1958.
- [31] Errera, M., In *Handbuch der Protoplasmaforschung*, Ed. by Heilbrunn, L. V. and Weber F., Vienna, Vol. 10, 1957.
- [32] Euler, H. and Hevesy, G., *Kgl. Dansk. Videnskab. Selskab. Biol. medd.* **17**, No. 8, 3, 1942, 引自 "Studies in Radiotherapeutics" (Michell J. S.) p. 30, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960.

- [33] Euler, H. and Hevesy, G., *Arkiv for Kemi* 17 A, No. 30, 1944, 同 32.
- [34] Fellas, V. M., Meschan, I., Day, P. L. and Douglass, C. D., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**: 231, 1954.
- [35] Förssberg, A. and Klein, G., *Exptl. Cell Res.*, **7**: 480, 1954.
- [36] Gould, D. M., Floyd, K. W., Whitehead, R. W. and Sanders, J. L., *Nature*, **192**: 1309, 1961.
- [37] Goutier, R., *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **67**: 15, 1959.
- [38] Goutier, R., *Progress in Biophysics*, **11**: 54, 1961.
- [39] Goutier-Pirotte, E. and Thounard, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **22**: 396, 1956.
- [40] Hagen, U., *Naturwissenschaften*, 168, 1958.
- [41] Harbers, E. and Backmann, R., *Exp. Cell Res.*, **10**: 125, 1956.
- [42] Harrington, H. and Lavik, P. S., *Arch. Biochim. Biophys.*, **54**: 6, 1955.
- [43] Harrington, H. and Lavik, P. S., *Cancer Res.*, **17**: 38, 1957.
- [44] Harrington, H., Rauschkolb, D. and Lavik, P. S., *Cancer Res.*, **17**: 34, 1957.
- [45] Holmes, B. E., *Brit. J. Radiol.*, **22**: 487, 1949.
- [46] Holmes, B. E., *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, Churchill: London, p. 225, 1956.
- [47] Holmes, B. E., *Ann. Rev. Nuclear Sci.*, **7**: 89, 1957.
- [48] Holmes, B. E. and Mee, L. K., in "Radiobiology Symposium" (Z. M. Bacq and P. Alexander, eds.), p. 220~224, Academic Press, New York, 1955.
- [49] Hornsey, S. and Howard, A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **63**: 915, 1956.
- [50] Howard, A., *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, Churchill: London, p. 196, 1956.
- [51] Howard, A. and Pelc, S. R., *Heredity (Suppl.)*, **6**: 261, 1953.
- [52] Jaffe, J. F., Lajtha, L. G., Lascelles, J., Ord, M. D. and Stocken, L. A., *Int. J. Rad. Biol.*, **1**: 241, 1959.
- [53] Jardetzky, C. D., Barnum, C. P. and Vermund, H., *J. Biol. Chem.*, **222**: 421, 1956.
- [54] Jovanovic, M. and Voncina, A., *Bull. Inst. Nucl. Sci.*, Boris Kidric **9**: 189, 1959.
- [55] Kanazir, D. and Errera, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**: 62, 1954.
- [56] Kelly, L. S., *Progress in Biophysics*, **8**: 144, 1957.
- [57] Kelly, L. S. and Bennett, E. L., *Rad. Res.*, **5**: 486, 1956.
- [58] Kelly, L. S., Hirsch, D., Beach, G. and Payne, A. H., *Rad. Res.*, **2**: 490, 1955.
- [59] Kelly, L. S., Hirsch, J. D., Beach, G. and Palmer, W., *Cancer Res.*,

- [60] Kornberg, A., Lehman, I. R., Bessman, M. J. and Simms, E. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**: 197, 1956.
- [61] Kowlessar, O. D., Altman, K. I. and Hempelmann, L. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**: 362, 1954.
- [62] Kowlessar, O. D., Altman, K. I. and Hempelmann, L. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**: 355, 1955.
- [63] Kurnick, N. B., *Rad. Res.*, **13**: 263, 1960.
- [64] Kurnick, N. B., Massey, B. M. and Sandeen, G., *Rad. Res.*, **9**: 141, 1958.
- [65] Kurnick, N. B., Massey, B. M. and Sandeen, G., *Rad. Res.*, **11**: 101, 1959.
- [66] Lajtha, L. G., *The Nucleic Acids*, edited by Chargaff and Davidson, Vol. III, p. 527, Academic Press, New York, 1960.
- [67] Lajtha, L. G., Oliver, R. and Ellis, F., *Brit. J. Cancer*, **8**: 367, 1954.
- [68] Lajtha, L. G., Oliver, R. and Ellis, F., in "Radiobiology Symposium" (Z. M. Bacq and P. Alexander, eds.), p. 216~219, Academic Press, New York, 1955.
- [69] Lajtha, L. G., Oliver, R. and Ellis, F., in "Advances in Radiobiology" (G. de Hevesy, A. Forssberg, J. D. Abbatt eds.), p. 54~58, Oliver & Boyd, Edinburgh, 1957.
- [70] Lajtha, L. G., Oliver, R., Kumatori, T. and Ellis, F., *Rad. Res.*, **8**: 1, 1958.
- [71] Lajtha L. G., Oliver R., Berry R. and Noyes W. D., *Nature*, **182**: 1788, 1958.
- [72] Longan, R., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**: 291, 1959.
- [73] Lutwak-Mann, C., *Biochem. J.*, **52**: 356, 1952.
- [73a] Main, R. K., Cole, L. H. and Walwick, E. R., *Nature*, **193**: 995, 1962.
- [74] Mandel, P. and Chambon, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **31**: 560, 1959.
- [75] Mitchell, J. S., *Nature*, **146**: 274, 1940.
- [76] Mitchell, J. S., *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **23**: 285, 1942.
- [77] Mitchell, J. S., *Studies in Radiotherapeutics*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960.
- [78] Mole, R. H. and Temple, D. M., *Int. J. Rad. Biol.*, **1**: 28, 1959.
- [79] Nias, A. H. W. and Paul, J., *Int. J. Rad. Biol.*, **3**: 431, 1961.
- [80] Nygaard, O. F. and Potter, R. L., *Rad. Res.*, **10**: 462, 1959.
- [81] Nygaard, O. F. and Potter, R. L., *Rad. Res.*, **16**: 243, 1962.
- [82] Okada, S., Gordon, E. R., King, R. and Hempelmann, L. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**: 469, 1957.

- [83] Okada, S. and Kallce, E., *Exptl. Cell Res.*, **11**: 212, 1956.
- [84] Okada, S. and Kallce, E., *Rad. Res.*, **5**: 589, 1956.
- [85] Okada, S. and Peachey, L. D., *J. Biochem. Biophys. Cytol.*, **3**: 239, 1957.
- [86] Okada, S., Schlegel, B., and Hempelmann, L. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **28**: 209, 1958.
- [87] Ord, M. G., and Stocken, L. A., *Biochem. J.*, **63**: 5, 1956.
- [88] Ord, M. G., and Stocken, L. A., in "Advances in Radiobiology" (G. de Hevesy, A. Forssberg, J. D. Abbatt eds.), p. 65~69, Oliver & Boyd, Edinburgh, 1957.
- [89] Ord, M. G. and Stocken, L. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **29**: 201, 1958.
- [90] Ord, M. G. and Stocken, L. A., *Biochem. J.*, **68**: 410, 1958.
- [91] Ord, M. G. and Stocken, L. A., *Nature*, **182**: 1787, 1958.
- [92] Ord, M. G. and Stocken, L. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **37**: 352, 1960.
- [93] Osawa, S., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E., *J. Gen. Physiol.*, **40**: 491, 1957.
- [94] Painter, R. B., McAlpine, V. W. R. and Germanis, M., *Rad. Res.*, **14**: 653, 1961.
- [95] Parizek, J., Arient, M., Dienstbier, Z. and Skada, J., *Nature*, **182**: 721, 1958.
- [96] Parizek, J., Arient, M., Dienstbier, Z. and Skada, J., *Мед. Радпол.*, **5**: 3, 31, 1960.
- [97] Paul, J., *The Cell Nucleus*, edited by J. S. Mitchell, p. 147, Butterworths, London, 1960.
- [98] Pelc, S. R. and Howard, A., *Rad. Res.*, **3**: 135, 1955.
- [99] Potter, R. L., *Fed. Proc.*, **18**: 304, 1959.
- [100] Potter, R. L. and Buettner-Janusch, V., *Rad. Res.*, **9**: 168, 1958.
- [101] Quastler, H., *Rad. Res.*, **4**: 303, 1956.
- [102] Richmond, J. E., Ord, M. G. and Stocken, L. A., *Biochem. J.*, **66**: 123, 1957.
- [103] Roth, H. S., Eighel, H. J., *Rad. Res.*, **9**: 173, 1958.
- [104] Sherman, F. G. and Quastler, H., *Rad. Res.*, **9**: 182, 1958.
- [105] Smellie, R. M. S., Humphrey, G. F., Kay, E. R. M. and Davidson, J. N., *Biochem. J.*, **60**: 177, 1955.
- [106] Smellie, R. M. S., McArdle, A. H., Keir, H. M. and Davidson J. N., *Biochem. J.*, **69**: 37 p. 1958.
- [107] Stacey, K. A., *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **5**: 486, 1961.
- [108] Stocken, L. A., *Rad. Res. (Suppl.)*, **1**: 53, 1959.
- [109] Thomson, J. F., Tourtelotte, W. W. and Cartlar, M. S., *Pro. Soc.*

Exp. Biol. Med., 80: 268, 1952.

- [110] Toal, J. N., Reid, J. C., Williams, R. B. and White, J., J. Natl. Cancer Inst., 21: 63, 1958.
- [111] Tsuya, A., Bond V. P., Fliednor, T. M. and Feinendegen, L. E., Rad. Res., 14: 618, 1961.
- [112] Van Lancker, J. L., Biochim. Biophys. Acta, 33: 587, 1959.
- [113] Van Lancker, J. L., Biochim. Biophys. Acta, 45: 57, 1960.
- [114] Walwick, E. R. and Main, R. K., Biochim. Biophys. Acta, 55: 225, 1962.
- [115] Weymonth, P. P., Rad. Res., 8: 307, 1958.
- [116] Wheeler, C. M. and Okada, S., Int. J. Rad. Biol., 3: 23, 1961.
- [117] Whitfield, J. F. and Rixon, R. H., Exptl. Cell Res., 18: 126, 1959.

第十三讲 电离辐射对核酸 代謝的影响(二)

沈 同

北京大学生物学系生物化学教研室

一、电离辐射对核酸代謝影响的 三个不同水平的研究

研究电离辐射对核酸代謝影响的三个不同水平是：(1)用生物高分子——DNA 的水溶液进行电离辐射的照射，并观察 DNA 及 DNA 水溶液物理化学特性的改变；(2)就細胞水平，研究照射对核酸代謝的影响；(3)就生物有机体的整体水平，特别是高等动物的整体水平，研究照射对核酸代謝的影响。

为了逐渐深入揭露生命过程，我們从生物高分子、細胞和有机体整体三个不同水平进行研究，这是完全必要和可行的。达尔文的进化論和巴甫洛夫的高級神經活动的研究都是从有机体整体水平出发，才成功地揭露了生物进化和高等动物大脑两半球神經活动过程的规律性。細胞遗传学和实验胚胎学的研究，则是从細胞水平出发，揭露了生物遗传、細胞分化和个体发生方面的客观规律。至于运用物理化学的方法，研究生物高分子，特别是核酸及蛋白质，和它們的水溶液，目前已有大量的工作在进行着，并已取得极大的科学成果。以上列举了一些例子，說明高分子、細胞和有机体整体这三个水平的研究是互相区别的；但是它們之間又是有联系的，可以互相促进和互相补充。巴甫洛夫曾說过，研究大脑皮层的机能可有三个不同的水平：第一是有机体整体的水平，研究兴奋和抑制的神經活动过程；其次，就种族发生上处于不同阶段动物的

神經活动进行比較研究；第三种研究是神經活动的物理化学特性的研究。巴甫洛夫指出，为了要比較透彻地闡明大脑皮层的机能，有必要对神經活动过程进行物理化学方面的研究。达尔文在概括生物的进化时，指出了研究生物遗传变异的重要意义；随着进化論之后而兴起的細胞遗传的研究，也可以被认为是生物进化論所促进的。

电离輻射对核酸代謝影响的三个不同水平的研究，它們之間也既有联系，又有区别。它們都是研究电离輻射这个外因，如何通过不同的内因而起作用。不同的内因，有如图解(图 1)所表示的：(1) DNA 水溶液，(2)細胞，和(3)多細胞生物机体。生物高分子水溶液属于无生命物质运动的范围；而細胞和多細胞生物机体则属于有生命物质运动的范围。有生命物质运动是由无生命物质运动辯証轉化而来的。闡明了电离輻射对 DNA 水溶液的影响，才有可能比較透彻地去了解电离輻射对細胞及多細胞生物机体的影响。由于有机体是力学、物理学和化学的高度統一，有生命物质运动不仅按照物理化学的规律运动着，而且也有着高一級的物质运动规律，例如关于新陳代謝、遗传变异等规律；这些高一級的物质运动规律不是力学、物理学和化学中各类规律的简单凑合，而是它們的高度綜合。根据以上的論述，我們可以看出电离輻射对 DNA 溶液的影响和电离輻射对生物机体的影响是有质的区别，但

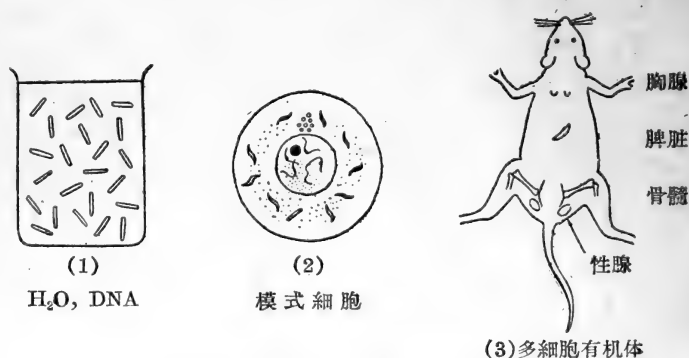


图 1 电离輻射这个外因通过不同内因而起作用

是在物质运动的发展上又是有联系的。

生物有机体的特点也許可以列举出三点:(1)生物有机体可以被看作是蛋白质、核酸等高分子的极为复杂的水溶液体系,是一种复杂的胶体溶液;(2)它和周围环境既有明确的界限,又有不断的物质交换,即新陈代谢;(3)它在空間和时间方面有高度完善的組織,也就是說生物机体有复杂的形态結構,和生理机能及代謝变化方面的協調和严格的順序性。

細胞和多細胞生物机体虽然同属于有生命物质运动的范围,但是也有区别。無論是单細胞生物或是离体的細胞都沒有多細胞生物机体所具有的細胞分化,和細胞之間的代謝協調和机能協調;多細胞生物机体在空間和时间方面更具有高度的組織化。

电离輻射这个外因的特点有三:(1)它是高能量电磁波;(2)穿透性或貫穿性;(3)导致激发和电离。同样是这一个外因,在通过不同的內因,即 DNA 水溶液、細胞和多細胞有机体时表现出不同的矛盾运动。以下就来討論这些不同的矛盾运动。

二、电离輻射对脫氧核糖核酸水溶液的影响

脫氧核糖核酸水溶液的体系主要包含 H_2O 和 DNA。电离輻射对这个水溶液体系的影响有下列各类問題:(1)电离輻射对水的作用;(2)电离輻射对 DNA 的作用;(3)电离輻射对 DNA 水溶液的作用是射綫直接作用于 DNA 分子而产生,还是通过水分子而間接作用于 DNA 分子,要是所說的直接作用和間接作用都是存在的,二者又各占全部射綫作用的百分之几;(4)DNA 水溶液一般都含有溶化于水的 O_2 , 并且所制备的 DNA 又常帶有微量的蛋白质作为杂质而存在;这溶化于水的 O_2 和作为杂质的蛋白质对射綫的作用又会产生什么复杂情况。现在就上述問題作一些討論如下:

(一) 水的电离 Dewhurst 等(1954)的論文题为“有关水和水溶液的放射化学的理論綜述”^[8],以及 Allen (1954) 的論文题为“水的电离輻射过程中游离 H 和 OH 的产量”^[1],都指出目前

我們还缺乏一致的、可靠的科学实验結果，因此还没有充足的根据来提出有关水的放射化学的理論。严格的、可以重复的实验技术还有待建立。我們现在引述这些放射化学家的結論，目的在于指出电离輻射对于水的作用也不是一个簡單的研究課題。在这个无生命物质运动水平的研究方面也有它的复杂性，和不断深入揭露真理的任务。

关于水的电离理論的研究，它是物理化学方面的研究任务，同时也受到放射生物学的影响而得到进展的^[18]。根据 Lea(1946)的假設^[14]认为在真正單純的水分子受到电离輻射照射的条件下，可能有两种情况产生氢和羥的两种自由基。一种情况是一些水分子可能由于激发而直接分解成氢的自由基和羥的自由基；在这种情况下所产生的两类自由基将靠近在一起。另一种情况是通过水分子的电离而产生自由基，在这种情况下只有羥的自由基会发生在电离的地点，而氢的自由基将跟羥的自由基有一定距离的間隔。茲借用 Haurowitz^[11]所引用的水的电子式，把水分子的电离，繪成图解(图 2)。自由基都具有一个非偶电子，它們的电荷是中和的。須要声明的是这个图解只是就作者的認識水平繪制的，錯誤之处，还請指正。

(二) 脫氧核糖核酸分子的射綫损伤 我們可以假想，电离輻射可以直接打进 DNA 分子，使得 DNA 分子受到损伤。此外，水

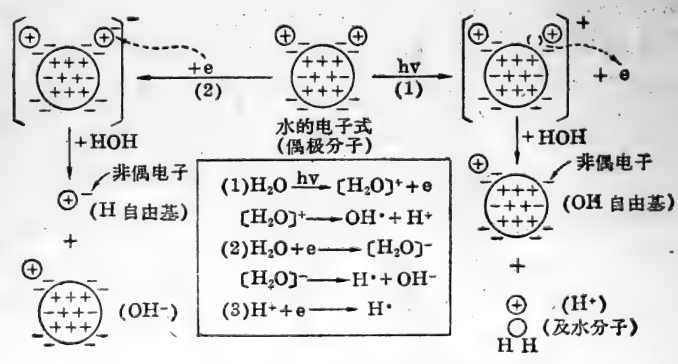


图 2 水分子的电离图解

分子經過照射所产生的自由基,主要是羥自由基,可以作用于溶液中的 DNA 分子,使得 DNA 分子上的糖和磷酸根的长鏈断裂,和碱基間的氢鍵断裂,等等。而氢鍵的断裂表现为隐藏性质的损伤。倘将具有损伤的 DNA 分子,用尿素处理,即可显示出 DNA 分子中的损伤,此时再测量 DNA 溶液的粘度,即有显著的下降(Butler, 1959)。中国科学院生物化学研究所李載平等(1961)也发现 DNA 分子的射綫损伤具有隐藏性质,加热处理,可以显示出隐藏的损伤。

(三) 射綫对脫氧核糖核酸分子的直接作用和間接作用 英国的 Butler 等^[5] 研究了电离輻射作用于 DNA 的两种作用,直接作用与間接作用的相对效应。这个研究課題的提出是这样的:根据 Lea (1946)的靶学說,射綫对水溶液中的 DNA 分子只有直接损伤的作用;根据水的电离学說,射綫能导致水的自由基的产生。考虑到水的自由基有重結合成为水分子的可能性,假如 DNA 的水溶液是很稀释的,照射后产生的水的自由基就会多些,但是由于 DNA 分子相对的稀少,有一部分水的自由基在沒有接触到 DNA 分子时,已經先重結合成为水分子。所以可以設想, DNA 水溶液愈是稀释,射綫的直接作用于 DNA 分子的机会就减少;射綫通过水的电离而間接作用于 DNA 分子的机会就增多;但是 DNA 水溶液的稀释一方面果然促进了射綫的間接作用,同时也由于自由基的重結合而限制了这个促进过程。因此,射綫对水溶液中 DNA 的直接作用和間接作用的相对效应将是 DNA 浓度的极为复杂的函数。Butler 等^[6]从动物肿瘤組織、病毒等材料提純了各种 DNA 制备,配制成 0.01~100% 的 DNA 水溶液,用 X 綫及 β 綫作射源,照射剂量为 4000~24,000 rad。电离輻射对 DNA 分子的损伤效应則由每一个 DNA 分子所占空間的初級电离次数来决定,这个初級电离次数又以 DNA 溶液原先的特性粘度(intrinsic viscosity) 的减半作指标。結果表明就某一种 DNA 制备来說,在 DNA 溶液的浓度由 1~100% 的范围内,导致溶液特性粘度减半所需的初級电离次数几乎接近一个常数;这个事实意味着在

这个 DNA 浓度范围内，水中发生的一次电离跟在 DNA 分子中发生的一次电离具有同等的 DNA 损伤效应。此外，实验结果也表明不同的 DNA 制备具有不同的射线敏感性，这也許由于 DNA 的純度不完全相同的原因。实验结果还表明所用的两种不同射源，X 綫及 β 綫，以及不同的硬度和剂率对射线损伤 DNA 的作用都是无关的。

苏联科学院生物物理研究所的 Mekshenkov^[15] 研究了同一课题，但是获得了不同的结果，即 X 綫对 DNA 分子损伤的直接作用和間接作用并不相等。这表明在 DNA 水溶液的体系里，电离辐射作用的问题也不是一个简单问题，在这里实验的条件、所用 DNA 的质量和浓度以及操作技术都是不容易控制和求得严格一致的。问题无疑是复杂的。阐明了电离辐射如何影响水溶液中的 DNA 分子，将为射线对生物机体及活细胞的影响这两个水平的研究提供物理化学方面的理论基础。

(四) 脱氧核糖核酸水溶液中的 O_2 和脱氧核糖核酸分子上的蛋白质杂质 在实际的情况下，DNA 的水溶液不可能仅仅含有 DNA 和 H_2O ；而經常会有溶化于水中的 O_2 ，和 DNA 分子所附着的微量蛋白质杂质。 O_2 的存在使得水的电离产物复杂化，增加了 HO_2 自由基和 H_2O_2 等。DNA 分子上所附着的微量蛋白质将对 DNA 分子的射线敏感性发生影响；倘根据电离辐射化学防护机制的电子自旋共振研究的一些结果^[9,17] 来推测，蛋白质杂质的存在便可能有防护 DNA 分子射线损伤的作用；Butler 等 (1958) 的结果也表明了这种可能性。总之， O_2 和蛋白质的存在，使得 DNA 水溶液的系统变得复杂。阐明电离辐射对这种复杂的 DNA 溶液系统的影响，一方面是研究工作更困难了；在另一方面，问题的逐步解决，将对射线影响生物机体及活细胞的研究，更具有启发和促进的作用。

三、电离辐射对细胞核酸代谢的影响

我們將簡略討論細胞結構和核酸代謝的联系；两类核酸，

DNA 和 RNA, 以及蛋白质等物质在代謝上的联系。此外, 还预备介紹一些新途径的研究报导, 内容有細胞机能和 DNA 含量的关系, 及叶綠体上 RNA 碱基組成和光照的联系。

(一) 細胞結構 Kuzin^[11]在1962年論述了代謝过程的变化在細胞射綫损伤中的地位。論文中列有細胞精細結構的图式, 可以参考, 在这里不再引用了。Kuzin 着重指出細胞多层薄膜結構的射綫损伤的重要意义。細胞薄膜結構有細胞浆內的內质膜、綫粒体, 等等。多层薄膜的射綫损坏导致渗透作用、酶分子的正常排列和催化过程的破坏。因此, 从电离輻射对細胞精細結構破坏的角度来研究射綫对核酸代謝的影响, 确是一个新开辟的研究領域, 工作正在开展。此外还应提到 Koller^[12]在1954年报告的染色体的精細結構和射綫导致的染色体畸变和断裂。染色体是核蛋白構成的, 主要成分是 DNA。而射綫誘变, 和射綫抑制細胞有絲分裂, 都和染色体中 DNA 代謝有联系; 这一方面的核酸代謝的研究工作, 还刚刚开始。

(二) 脫氧核糖核酸、核糖核酸和蛋白质等的代謝联系 从細胞是一个整体、細胞內各种物质代謝之間是互相联系和互相制約这些观点出发, 在探討細胞核酸代謝所受到照射的影响时, 應該注意 RNA, DNA 和蛋白质等物质代謝以及能量代謝之間的联系。在細胞內 RNA 分布在核仁及細胞浆內, 而 DNA 則在核內; 这些不同的分布又与細胞的精細結構紧密联系, 与細胞的分裂、分化、遗传、变异等机能紧密联系。这种情况跟 DNA 水溶液体系的情况比較起来, 显然有质的区别。关于电离輻射影响方面的研究, 可以介紹1959年在英国剑桥大学放射治疗系举行的細胞核討論会記錄(Mitchell, 1960^[13])作为参考, 不再多談。

(三) 細胞机能和脫氧核糖核酸含量 比利时根脫大学的 Branez 及 Roels^[14]在1961年报导了雌性大白鼠在动情周期中, 腎上腺皮层細胞核中 DNA 含量有变动。他們用細胞光度分析法研究腎上腺皮层各个层次中細胞核的 DNA 含量, 发现各层細胞核的 DNA 含量在动情前期都比較低, 而在动情間期高些, 在动情期最

高，要比动情前期高出約 7~29%。这个观察表明有些細胞核的 DNA 含量并不是恒定的，而是随着細胞的机能而发生变化。由于这个观察結果跟細胞核 DNA 含量恒定的概念有抵触，同时指出了細胞机能和 DNA 含量联系的可能性，这是一个有意义的发现。这一方面的研究还应重复和扩大。

（四）眼虫叶綠体上的核糖核酸碱基組成和光照的联系
Brawerman 及 Chargaff^[4]报导了当眼虫在形成叶綠体时有新的 RNA 类型的出现。眼虫在黑暗条件下培养是沒有叶綠体的；当改为光照条件下培养时，即出现大量蛋白质合成，同时出现的是 RNA 含量的增高。在比較黑暗和光照条件下生长的眼虫所含 RNA 的碱基組成时，发现它們之間是不尽相同的。这个发现暗示光照时在叶綠体发展过程中出现特异的 RNA 类型。这个报导对核酸代謝的研究是有指导意义的；即 RNA 的合成可以受到环境条件——光照条件的影响。

以上介紹的两个新的研究报导給我們提供了启示，即电离輻射作为环境条件，很有可能影响核酸代謝，表现在細胞核酸含量的多少上，也可以表现在核酸的碱基組成上。现在不仅有一个哲学的指导思想，即生物有机体与环境的統一，而在放射生物学的科学实践上，确已看到进一步揭露自然辯証法的門径。

四、电离輻射对整体动物核酸代謝的影响

（一）整体高等动物 我們試把一杯 DNA 水溶液同一只活小鼠作比較，我們分析二者之間的联系和二者之間质的差別。小白鼠也不妨被看作是一种复杂的生物高分子的胶体溶液体系，但是，这个体系在空間和时间方面是高度組織化了的。原生质分化和組合成各种細胞、組織、器官和系統，而成一个多細胞的生物有机体；并通过神經体液的作用，保持着一个稳定的机体內环境，同时还保持着有机体在功能和代謝方面的協調和严格的順序性。这样一个高度組織化了的生物机体，当受到电离輻射这个外界因素的干扰时，任何一个時間、任何一个部位的干扰必然牵动全局，引起复杂

的反应。生物机体这种受干扰和有反应,都是通过生物机体原有的同化作用和异化作用的矛盾运动而体现出来的。就核酸代谢来说,动物体内的两类核酸不知有多少种类型,分子量及化学结构都有所差异;许多类型的核酸又是不均匀地分布在全身的每一个细胞里;各个细胞里的核酸则在进行着不断的同化作用和异化作用;代谢强度和类型又是不尽相同的,这种代谢随着生物体不同发育阶段和不同生理情况,又表现出千差万异的代谢变化。在这样一个非常复杂的物质运动的背景上,外来的光量子、电子、质子等的贯穿性的打入,无论是直接作用于核酸或是通过水分子间接作用于核酸,必然产生干扰和反应。我们所观察到的是机体在照射以后一定时间内某些细胞,例如淋巴球、生殖细胞等的结构和机能的破坏,和遗传物质基础的变异等等。在 DNA 水溶液的情况下,我们观察照射影响时需要极大剂量,才能看到 DNA 溶液粘度的下降。而霍中和等报告^[22]在小白鼠则只需全身照射 720 伦琴,在 24 小时后即能观察到胸腺的显著变化(图 3);高伟良报告^[20]甚至只需全身照射 50~100 伦琴,即能观察到卵泡的显著变化。这些细胞形态的变化反映核酸含量的变化^[22]和核酸代谢的变化。问题的复杂化还表现在下列的现象上,即局部的照射可以影响全身;身体各部分和各类细胞又具有不同的射线敏感性。多细胞生物机体的情况无疑是极端复杂的;但是,我想,假如我们抓住多细胞生物机体的最突出的情况,即全身细胞结构、机能和代谢的高度协调的情况,去实验观察,也许我们可以比较全面地去探索电离辐射对高等动物核酸代谢影响的奥秘。下面再就高等动物机体协调因素,作简略的叙述。

(二) 神经 Grigoryev^[10]在 1954 年所作的临床观察,发现病人腹部受到钴 60 的治疗,照射剂率为每分钟 7.6 伦琴,在照射腹部的 20 分钟内,病人脑电波出现了与照前及照后显著不同的电位变化。这表明腹部的照射,在几分钟的短时间内反映在神经系统的高级部位。Caster 等^[7]用 700 伦琴的 X 射线照射大鼠全身,发现在照后 3~12 小时,出现脑 DNA 含量的显明的减少,和脑电波

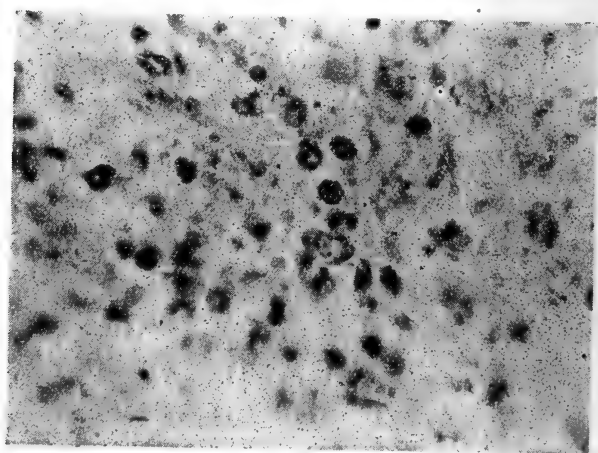
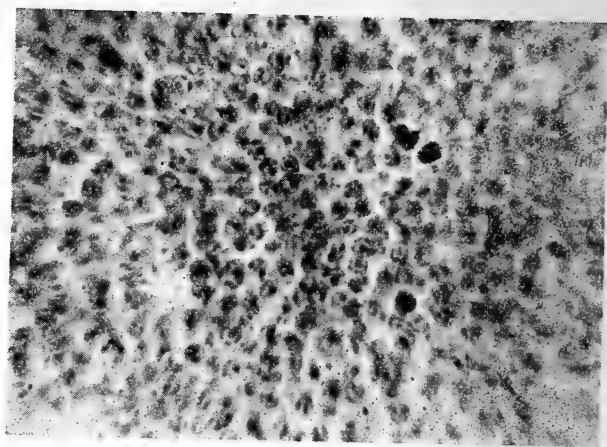


图3 小白鼠全身照射 720 伦琴 24 小时后的胸腺变化

的变化。Caster 等曾經假設腦中可能存在一小簇的射綫敏感細胞。

(三) 体液 Benjamin 及 Yost^[2] 用X綫照射大鼠的實驗，証明脾和肝細胞里的氧化磷酸化过程所受射綫的影响是通过射綫照射影响了內分泌腺机能而間接产生的。前面所提到的 Branez 及 Roels^[3] 关于雌性大鼠肾上腺皮层細胞 DNA 含量随着动情

周期而周期性地发生变化；这就暗示了激素对核酸代謝的調节。循着这条綫索去探索体液对核酸代謝的控制，我想，这是值得尝试的。

（四）生物高分子的特异性 蛋白质的特异性表现在动物机体的血清免疫反应、异蛋白的过敏反应等等上面；核酸的特异性表现在蛋白质合成密碼作用、遗传变异的物质基础等等上面。高等动物由一个受精卵发生而成为一个成年的个体，这个动物发生过程的代謝奥秘，还有待探索，但是受精卵的生物高分子，特别是DNA的特异性，无疑是一个重要关键。我們再联系射綫誘导变异的现象来思考，电离輻射对整体动物核酸代謝的影响这个研究課題的重要含义和广闊的領域，便将更为人們所認識了。

五、結 束 語

电离輻射对核酸代謝影响的三个不同水平的研究，即射綫对DNA水溶液、細胞及生物机体整体核酸代謝的影响的研究，各有不同的研究課題和不同的研究方法。生物整体水平的研究已經在生物科学上取得极伟大的成就；而生物高分子水平的研究在近二十多年来最为活跃并正在取得巨大的进展；至于細胞水平的研究則处于生物高分子研究及生物整体研究之間，物理化学方面新技术、新理論正从分子水平推进到亚細胞結構，而从生物整体研究得出关于有生命物质运动发展的思想正在指导着細胞水平的研究。因此，我們也許可以說，电离輻射对細胞核酸代謝影响的研究是当前三个不同水平研究中的关键。推动了这个中間环节，我們就能够較快地推动放射生物化学前进。

参 考 文 献

- [1] Allen, A. O., Radiation Research, 1: 85, 1954.
- [2] Benjamin, T. L. & Yost, H. T., Jr., Radiation Research, 12: 613, 1960.
- [3] Branez, E. & Roels, H., Nature, Lond., 192: 1043, 1961.
- [4] Brawerman, P. & Chargaff, E., Biochemistry (American Chemical Society), 1: 128, 1962.

- [5] Butler, J. A. V., Pain, R. H., Robins, A. B. & Rotblat, J., *Proc. Roy. Soc. B*, **149**: 12, 1958.
- [6] Butler, J. A. V., in *Ciba foundation symposium, Ionizing radiation and cell metabolism*, (Churchill, London), p. 59, 1956.
- [7] Caster, W. O., Redgate, E. S. & Armstrong, W. P., *Radiation Research*, **8**: 92, 1959.
- [8] Dewhurst, H. A., Samuel, A. H. & Magee, J. L., *Radiation Research*, **1**: 62, 1954.
- [9] Gordy, W. & Miyagawa, J., *Radiation Research*, **12**: 211, 1960.
- [10] Grigoryev, U. G., in *Progress in Nuclear Energy Series VI, Biological Sciences*, Pergamon Press, **2**: 303, 1959.
- [11] Haurowitz, F., *Chemistry and Biology of Protein*, Academic Press, 1950.
- [12] Koller, P. C., *Progress in Biophysics*, **4**: 195, 1954.
- [13] Kuzin, A. M., *Radiobiology (USSR)*, **2**: 340, 1962.
- [14] Lea, D. E., *Actions of radiations on living cells*, Second edition, Cambridge, 1955.
- [15] Mekshenkov, M. I., *Radiobiology (USSR)*, **2**: 181, 1962.
- [16] Mitchell, J. S., *The Cell Nucleus*, Butterworths, London, 1960.
- [17] Smaller, B. & Avery, E. C., *Nature, Lond.*, **183**: 539, 1959.
- [18] Weiss, J., *Nature, Lond.*, **153**: 748, 1944.
- [19] 李载平, 景沛, 吕新法, 钱肖贞, *生物化学与生物物理学报*, **1**: 26, 1961。
- [20] 高伟良, *北京大学毕业论文*, 1962。
- [21] 陆如山, *电离辐射对核酸代谢的影响(一)*, 见本演讲集。
- [22] 翟中和, 罗毓联, 沈同, *未发表资料*, 1961, 1962。

第十四讲 抗代謝物与核酸代謝

王 振 綱

中国医科大学药理教研室

一、引 言

抗代謝物 (anti-metabolite) 或称代謝拮抗物 (metabolic antagonist), 是一种人工合成的或生物体内天然存在的化学物质, 其化学结构与生活过程中一些天然存在的必需代謝物 (metabolite) 类似。如将这种与必需代謝物相似的物质 (analog) 纳入体内, 由于其结构与代謝物相似, 则抗代謝物与必需代謝物发生特异性的(对抗)拮抗作用 (antagonism), 这种作用表现为二者与同一酶的生化反应的活力中心相互竞争, 影响酶与基质的正常反应速度, 最后减少或抑制产物的生成, 故常又将抗代謝物称为抑制剂 (inhibitor, 简称 I)。

抗代謝物与酶结合后的复合物, 不象正常代謝物与酶结合的复合物那样易于分解, 往往使一个酶陷入复合物内, 致体内代謝物不能或很少与酶结合, 于是机体出现种种异常的代謝现象, 或导致某种必需代謝物的缺乏, 甚至引起生物或动物死亡。

过去对抗代謝物的作用机制是以经典的“鎖与钥匙”学说 (lock and key theory)^[54] 来解释的, 近年来 Baker 等^[8, 4] 提出了一个新的“鎖与钥匙”学说, 他们认为一个抗代謝物与代謝物不一定在结构上完全相似, 仅在分子结构中有一部分, 或一侧能与酶蛋白的受体相结合即可产生抗代謝物的作用, 它的另一侧可以自由改变。Baker 等根据许多实验资料并提出内烃基化及外烃基化的理论学说。

近年以来，学者們也注意到反饋机制(feedback mechanism)是抗代謝物的一个重要的作用方式，通过这一新的概念，将能解释为什么一些化学結構不同的化学物质，能对同一代謝物发生拮抗作用。这一学說也必然会联系到受体学說(receptor theory)^[38]。有关抗代謝物作用的假說，正在分子药理学及酶学基础上向前发展中。

抗代謝物在药理学发展史中有着悠久的历史^[36,39,51,52]，目前在临床上应用的抗代謝物种类很多，它已不仅限于炎症的化学治疗，在抗寄生虫病以及抗病毒、抗組織胺、解毒、抗肿瘤等方面均已采用抗代謝物进行治疗。这些药物的药理作用已有不少专题文献报导，很多与核酸代謝有着密切的关系。正如 Todd^[46] 所說“一切事物最終与核酸有关”。本文拟重点地对一些抗代謝物与核酸代謝的研究做一綜述介紹。从而也可說明在不同专业研究核酸的重要性。

二、抗代謝物与核酸代謝

(一) 嘌呤类抗代謝物 嘌呤类抗代謝物很多，以应用于抗肿瘤方面的 6-巯基嘌呤及 6-硫代鳥嘌呤为代表，其化学結構见图 1 所示。这类抗代謝物都是以正常的嘌呤碱基如腺嘌呤、鳥嘌呤、黃嘌呤、次黃嘌呤等为基础，在其不同的輔基加以改变即成为类似物或抗代謝物。因为这类抗代謝物与天然代謝物相似，其抗代謝物的作用机制，在于影响嘌呤的生物合成。

1. 6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 簡称 6-MP) 6-MP 是由 Elion 及 Hitchings^[22,23] 于 1952 年合成的。Clarke 等^[18] 証明 6-MP 对小鼠肉瘤 S-180 有治疗作用，Burchenal^[9] 等于同年也发现其对人的白血病有疗效，目前 6-MP 不仅在临床上有一定的实用价值，而更重要的是它在理論研究上有着重要的意义，6-MP 可以被认为是一个“理論性实践”产物(rational empiricism)，通过对它的生物效能的研究总结了代謝理論和化学經驗^[48]。最初学者們研究了多种嘧啶及嘌呤結構的物质对依靠叶酸生长的一些

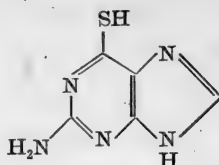
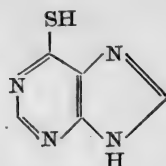
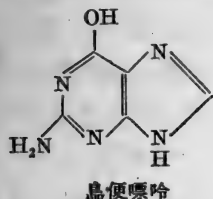
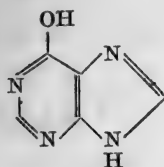
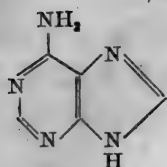
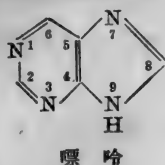


图 1 嘌呤抗代謝物的化学結構

微生物生长的影响,发现这些化合物均有不同程度的抑制作用,且 6-MP 在多种嘌呤衍化物中是最有效的一个。

对其作用机制的研究虽然经过多年来生物化学家的努力,至今仍不够了解。但从化学结构上看, 6-MP 与一些常被细胞所利用的鸟嘌呤及次黄嘌呤相似。Hamilton 等^[29]曾证明 6-MP 在体内可以转变为核苷酸; 这些核苷酸与正常嘌呤的相应核苷酸的区别, 仅是在第六位上的氧原子被硫取代。Skipper 等^[45]证明 6-MP 对嘌呤的重新合成 (biosynthesis de novo) 有抑制作用。Balis 等^[1]也获得类似的结果, 他们曾用小鼠肉瘤 S-180 观察到 6-MP 对甲酸并合到核酸中有抑制作用, 而对腺嘌呤的并合则无影响。Mandel 等^[85]曾用大肠杆菌发现 6-MP 对 RNA 及 DNA 均有抑制作用。Davidson^[17]认为 6-MP 主要是抑制次黄

嘌呤核苷酸經琥珀酰腺嘌呤核苷酸轉变为腺嘌呤核苷酸,但6-MP对次黄嘌呤核苷酸轉变为鳥嘌呤核苷酸的作用并不敏感。Mandel等^[83]利用大肠杆菌观察到6-MP对已合成的腺嘌呤及鳥嘌呤的利用并无影响。

Elion^[22]利用 S^{35} -6-MP 在小鼠試驗发现 S^{35} -6-MP 可以并合到小鼠的各种器官中的 RNA 及 DNA 部分,但为量极少。近来Beiber^[5]利用 S^{35} -6-MP 在小鼠腺癌-755 进行試驗,发现无论对6-MP敏感的或不敏感的瘤株,对 S^{35} -6-MP 并合到 RNA 及 DNA 的作用没有什么区别。Fodor 等^[27]最近观察到6-MP 对小鼠肿瘤內的含氮量及 DNA 有明显的降低作用。

最近年来,学者們曾用反饋机制解释6-MP的作用机制。这是一个新学說,很受到学者們的注意。Wyngaarden 等^[48]曾报告6-MP对嘌呤生物合成第一步的前身5-磷酸核糖胺有反饋性作用。但Lepage等^[32]未曾发现6-MP及別的一些化合物在嘌呤合成中对FGAR有堆聚现象,这一报告說明研究6-MP对5-磷酸核糖胺这一步反饋性的作用是非常有意义的。值得注意的是,如前所述,Balis等^[1]曾观察到6-MP对甲酸 C^{14} 并合到嘌呤的重新合成有明显的抑制作用,当时对这种特异反应不能解释,而今天可以推测为由于6-MP这个类似物經過代謝轉变为次黄嘌呤核苷酸,因此对嘌呤的生物合成第一步有抑制作用(见图4)。Welch^[48]并把6-MP这种反饋称为假的負反饋(pseudonegative feed back),并认为虽然还不能把这种負反饋作用看为是6-MP唯一的抗肿瘤的机制,但它将是6-MP及其他抗肿瘤药一个主要的研究方向。

总结以上資料,說明对6-MP作用机制已有很多研究,但矛盾处不少。6-MP在体内的代謝过程和对核酸代謝的影响,可以图2及图4来表示。

2. 硫代鳥嘌呤(Thioguanine, 簡称 TG) TG和6-MP在化学結構上很相似,因此其抗肿瘤作用也类似。Sartorelli等^[43]曾观察到肿瘤核酸的嘌呤合成过程中,利用鳥嘌呤及甘氨酸的



关于反馈机制与 TG 的抗肿瘤作用的关系, Lepage 等^[32] 曾利用各种腹水瘤细胞进行研究。他们发现 TG 及 6-MP 对小鼠肉瘤 180 有良好的治疗效果, 但从反馈方面来研究, 尚未见有显著



图3 TG 在体内代谢及对核酸代谢作用示意图 [34]

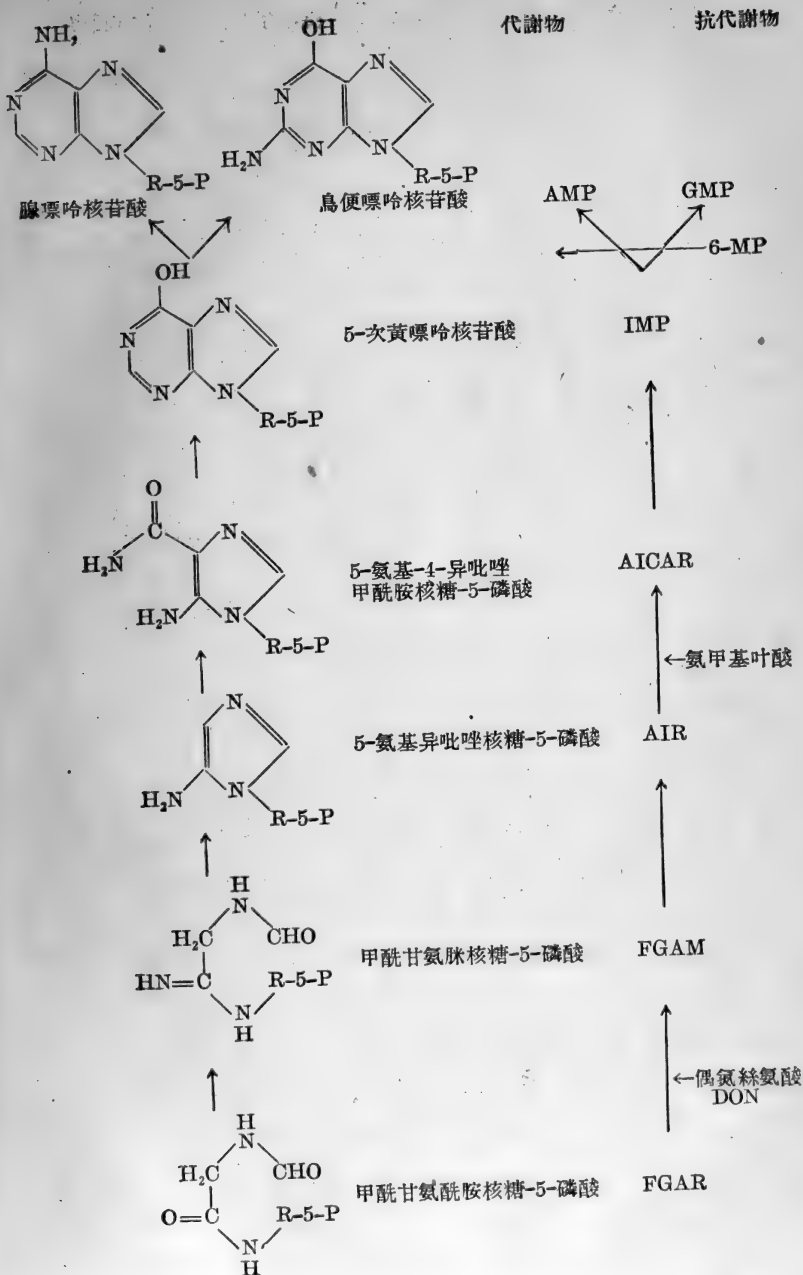
的区别，因此 Lepage 等认为 TG 的抗肿瘤作用与反馈机制的关系不大。

TG 在体内代谢及对核酸代谢的影响，可以图 3 表示。

总结嘌呤在体内的生物合成途径及抗代谢作用部位可见图 4。

(二) 嘧啶类抗代谢物 嘧啶类抗代谢物在肿瘤化学治疗的地位日趋重要，其中以 5-氟尿嘧啶类最引人注目，这一类的化学结构见图 5。

Rutman 等 [49] 在研究化学致癌物质引起肝癌的动物的核酸合成过程中，观察到动物利用尿嘧啶的能力远较正常动物肝脏要强。以上试验引起了 Heidelberg 等 [19,30] 的注意，他们认为尿嘧啶的利用增加虽然不是肿瘤所特有，但与肿瘤化学治疗似有一定的关系，不久他们就设计了尿嘧啶类的抗代谢物。他们为了减少抗代谢物与代谢物在结构上的差异过多，曾考虑到氟与氢原子半径体积很相似： $H=1.20 \text{ \AA}$ ， $F=1.35 \text{ \AA}$ ， $Cl=1.80 \text{ \AA}$ ，于是合



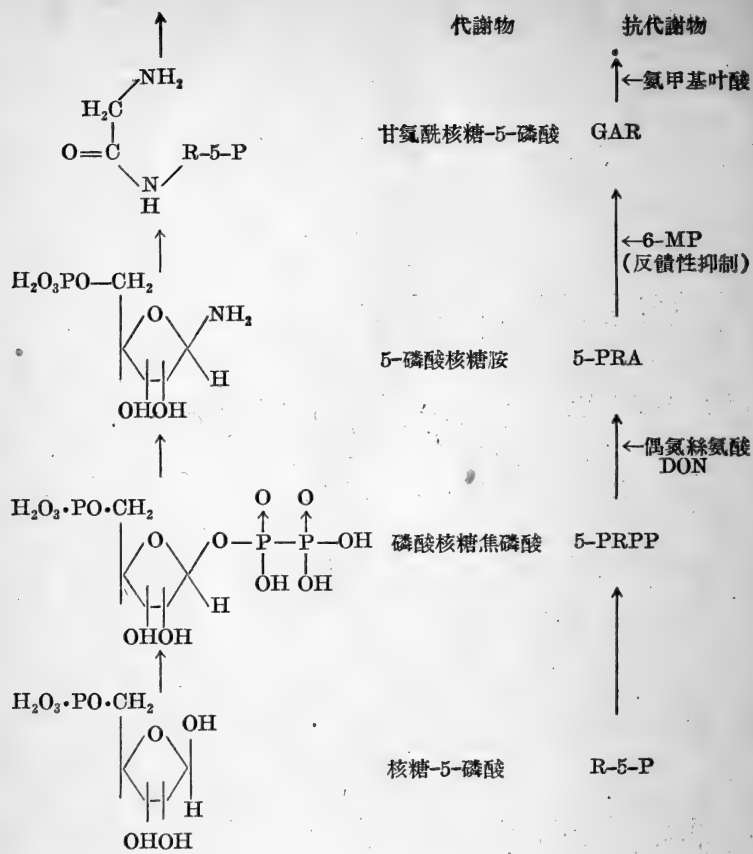


图4 嘌呤的生物合成与抗代谢作用途径

成了5-氟尿嘧啶这个化合物，以后陆续又合成了FUR及FUDR等^[20]。

最初Curreri及Ansfield^[15]发现5FU在中毒的剂量下对晚期肿瘤病人有明显的治疗效果。5FU对乳腺癌、直肠癌及肝癌有一定的疗效，因此引起学者们对5FU的注意。后来Cohen等^[14]也发现5FU及5FUDR对动物及人体肿瘤的疗效。Rich等^[41]曾用人的子宫颈癌细胞在组织培养试验，比较了5FU及5FUR、5FUDR的效果，发现后二者的疗效较FU要强。Chaudhuri等^[11]

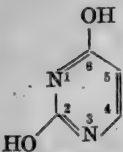
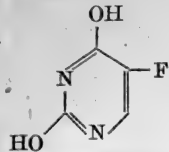
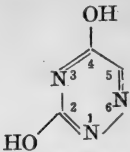
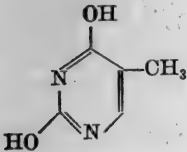
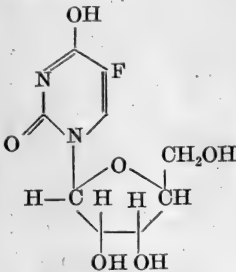
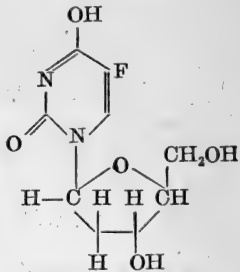
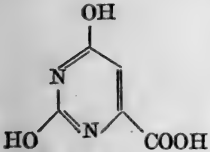
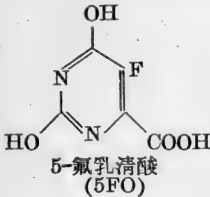
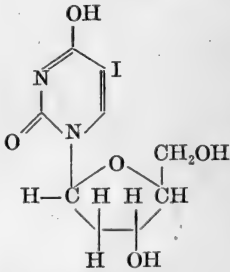
代 謝 物	抗 代 謝 物	
 <p>尿嘧啶</p>	 <p>5-氟尿嘧啶(5FU)</p>	 <p>6-偶氮尿嘧啶</p>
 <p>胸腺嘧啶</p>	 <p>5-氟尿嘧啶核苷 (FUR)</p>	 <p>5-氟尿嘧啶脫氧核苷 (FUDR)</p>
 <p>乳清酸</p>	 <p>5-氟乳清酸 (5FO)</p>	 <p>5-碘尿嘧啶脫氧核苷(IUDR)</p>

图5 嘧啶抗代謝物的化学結構

利用艾氏腹水癌观察到 5FU 代謝过程如下:



Chaudhuri 等^[12] 曾观察到 5FU 在小鼠肿瘤及肝脏組織中轉变为含氟的胸嘧啶核苷酸。根据已有的資料一致认为 5FU 影响尿嘧啶核苷酸聚合成 RNA, 及由尿嘧啶核苷酸轉向胞嘧啶核苷酸及胸腺嘧啶核苷酸, 其中主要是对 DNA 新合成中胸腺嘧啶的影响。Danneberg 等^[16] 曾結論性指出: 5FU 对胸腺嘧啶的作用是

直接的,而且这种作用要超过对甲酸的影响。Bosch 等^[4]曾用 C¹⁴ 标记的甲酸体外试验,发现 5FU 能抑制由甲酸进入胸腺嘧啶的合成,这是由于抑制尿嘧啶衍生物转向胸腺嘧啶的甲基化过程。Danneberg 等^[16]曾用小鼠体内实验,发现 5FU 对 DNA 合成过程中利用尿嘧啶及乳清酸有抑制作用。

Eidinoff 等^[21]也观察到类似上述的结果。Cohen^[14]曾用大肠杆菌进行试验,发现由脱氧尿嘧啶核苷酸到胸腺嘧啶核苷酸需要胸腺嘧啶核苷酸合成酶 (thymidylate synthetase), 此酶可以被 FUDRP 抑制, FUDR 作用较弱, FURP 无作用。他们并发现 FUDRP 与此酶的结合为不可逆反应,如预先加入大剂量的脱氧尿嘧啶核苷,则 FUDRP 的作用被减弱。Cohen 等^[14]认为 FUDR 是一种作用较强的杀菌剂,其杀菌的作用机制可能由于抑

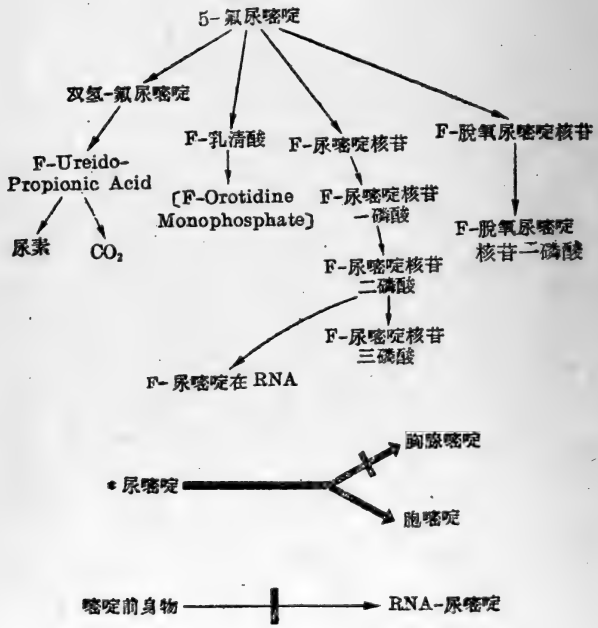


图 6 FU 在体内代谢及对核酸代谢作用示意图 (除有 * 处外,主要文献来源为[34])

制胸腺嘧啶的合成,使細菌造成所謂“缺少胸腺嘧啶的死亡”(thymine-less death)。Sköld 等^[44] 曾用艾氏腹水癌試驗,发现 5FU 有抑制尿嘧啶在核酸內合成的作用,而且认为这是 5FU 一个主要作用。Prusoff 等^[38] 近来合成了一类与胸腺嘧啶相类似的抗代謝物——碘化尿嘧啶脫氧核苷,設計这个化合物时考虑到可以碘代替胸腺嘧啶第五位碳原子上的甲基,因为碘与甲基的原子体积近似: $I=2.15\text{\AA}$, $\text{CH}_3=2.0\text{\AA}$, $\text{Br}=1.95\text{\AA}$ 。此药对胸腺嘧啶的生物合成有抑制作用,因此影响 DNA 的合成,經微生物、动物肿瘤以及临床初試,証明 IUDR 对 DNA 合成有抑制作用,唯临床应用毒性較大是其缺点。

有关嘧啶在体内生物合成途径及 5FU 及 IUDR 对核酸代謝的影响可参考图 6、7 及 8。

(三) 叶酸类抗代謝物 叶酸类抗代謝物应用于临床至今近十四年了^[24]。这类药物与磺胺的情况相同,都是先在临床应用,然后才查明其作用机制。近年来叶酸类抗代謝物从数目上沒有增多,但对其作用机制却了解得比較深入。

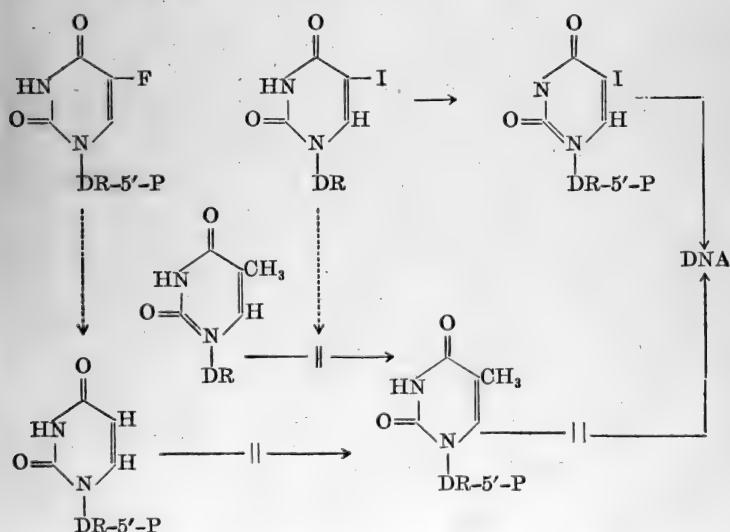


图 7 FUDR 及 IUDR 对核酸代謝作用示意图^[10]

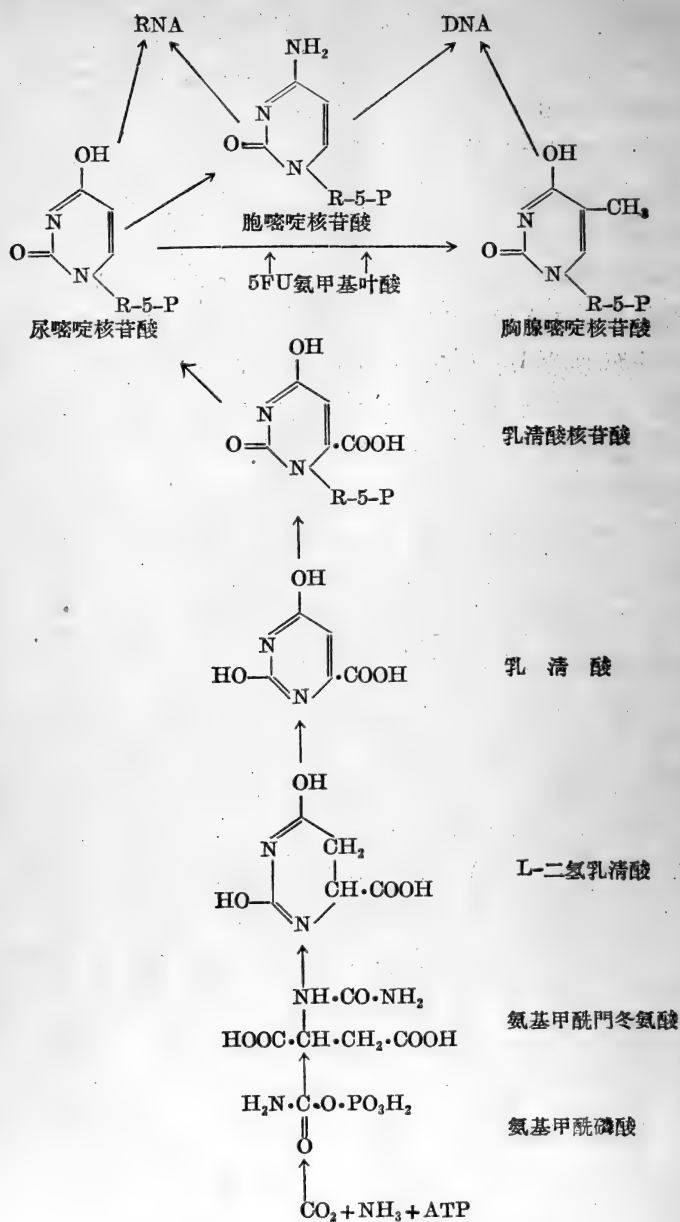


图8 嘧啶的生物合成与抗代谢物作用途径

叶酸类抗代谢物的化学结构见图9。

抗叶酸类代谢物的作用机制已有许多专题讨论^[18,81,84,40]。欲了解叶酸抗代谢物的作用,首先应了解叶酸在体内代谢过程。实际上“叶酸抗代谢物”这种说法不够正确,因为参加生物代谢反应不是叶酸,而是四氢叶酸(FAH₄)。FAH₄是一碳团代谢的辅酶,它

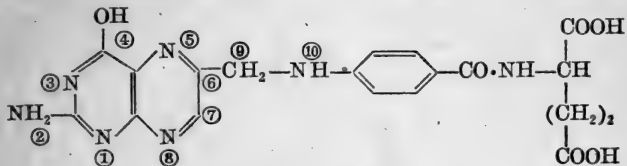
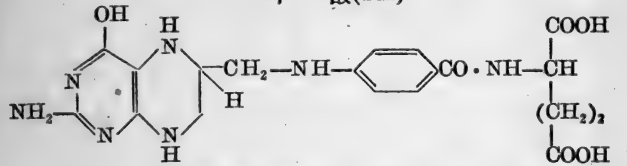
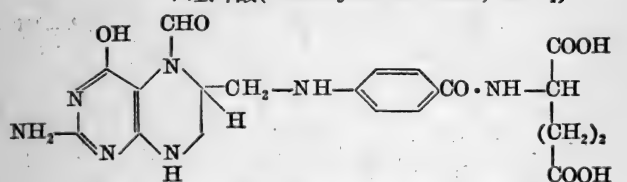
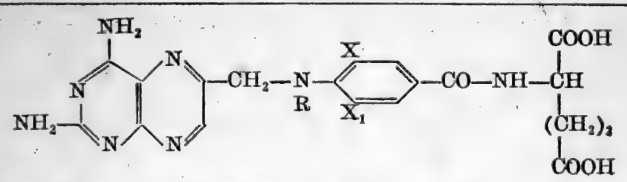
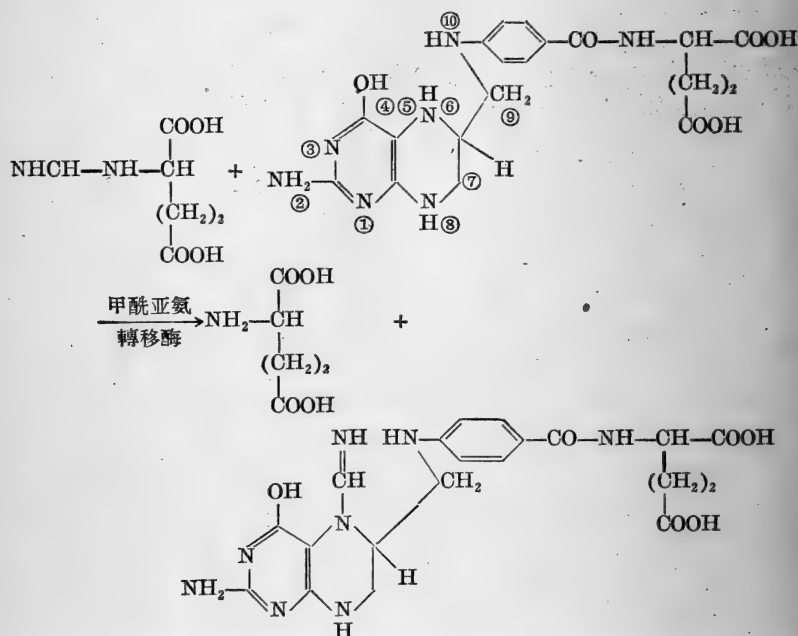
代 谢 物	 <p style="text-align: center;">叶 酸(FA)</p>
	 <p style="text-align: center;">四氢叶酸(Tetrahydrofolic acid, FAH₄)</p>
	 <p style="text-align: center;">5-甲酰四氢叶酸(Folinic Acid, leucovorin, citrovorum factor, 5-CHO-FAH₄)</p>
抗 代 谢 物	 <p>氨基 叶 酸(Aminopterin) R=X=X₁=H 氨 甲 基 叶 酸(Methotrexate, MTX) R=CH₃, X=X₁=H 二氯氨甲基叶酸(Dichloromethotrexate, DCMTX) R=CH₃, X=X₁=Cl</p>

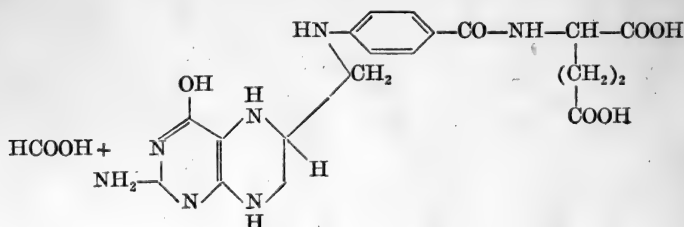
图9 叶酸抗代谢物的化学结构

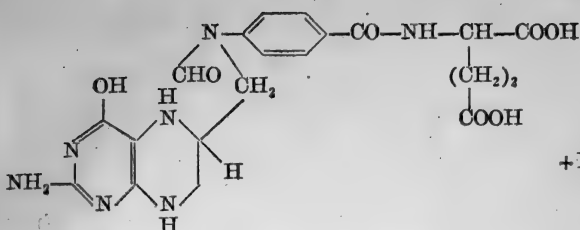
对核酸的生物合成及某些氨基酸代谢有着密切的关系。近来 Delmonte 等^[18]总结了 FAH_4 一碳转移的作用：

1. FAH_4 可以接受甲酰亚胺谷氨酸 (formiminoglutamic acid) 或甲酰亚胺甘氨酸 (formiminoglycine) 分子中的甲酰亚胺基 ($-\text{CHNH}$), 变为 5-甲酰亚胺 FAH_4 。

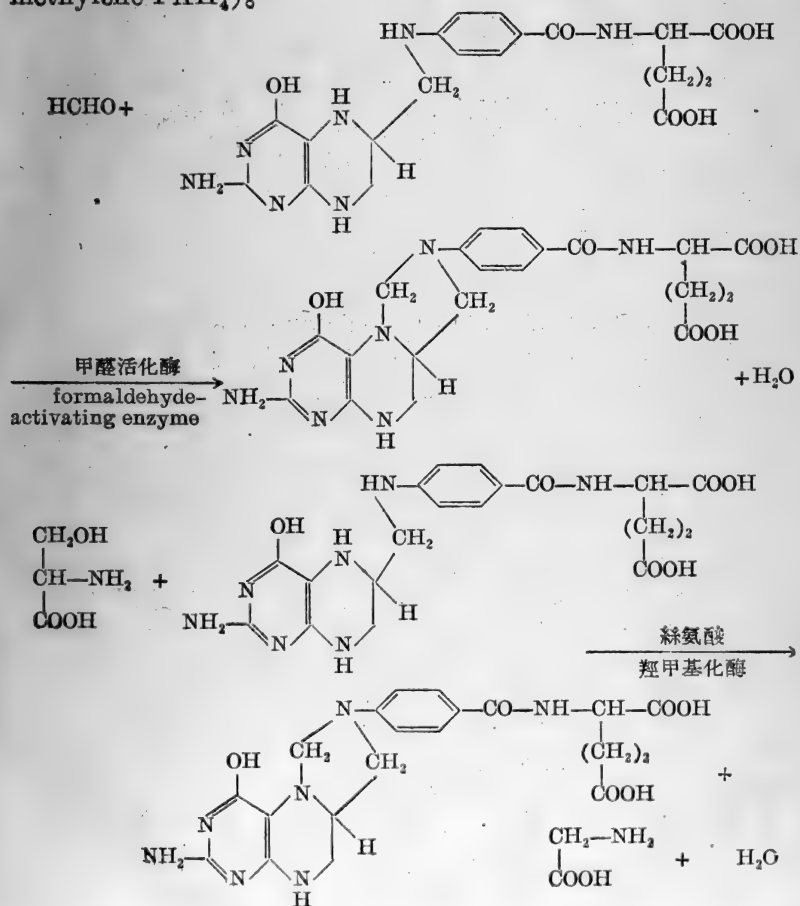


2. 甲酸可转移-CHO 至 FAH_4 的第十位变为 10-甲酰四氢叶酸 (10-CHO- FAH_4)。



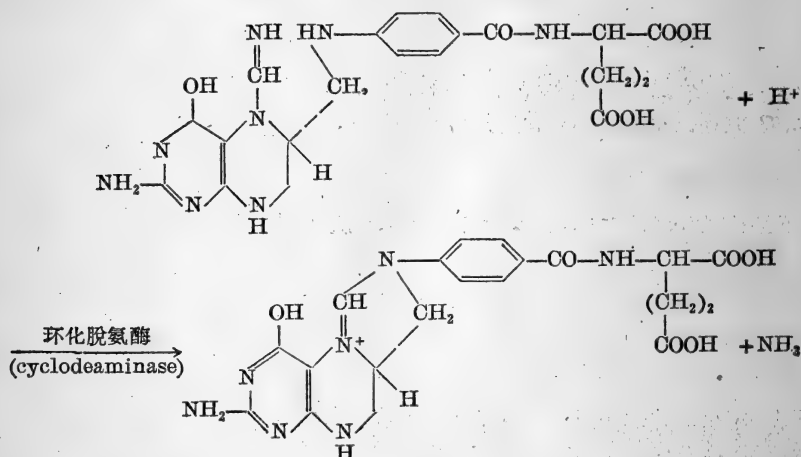


3. 甲醛或絲氨酸能轉移分子上的一 CH_2OH 至 FAH_4 的第十位，以後合環化失去一分子水變成 5, 10-甲烯 FAH_4 (5, 10-methylene FAH_4)。

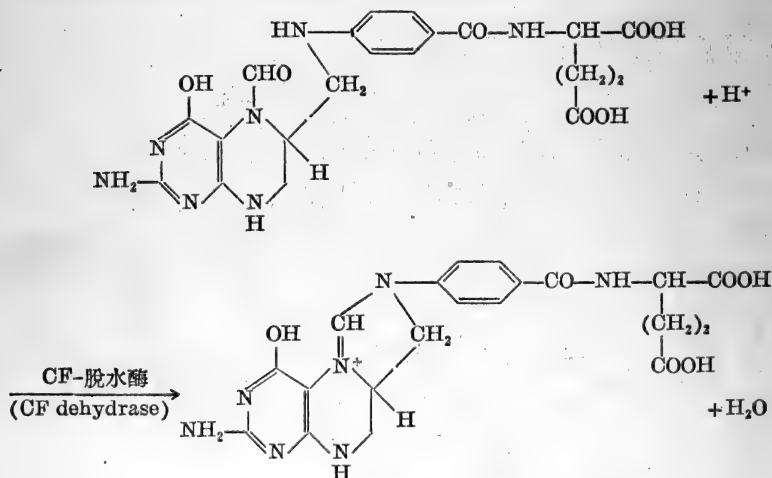


以上这三个 FAH_4 的化合物在一碳转移上起着下述的几个重要作用:

4. 5-甲酰亚胺基 FAH_4 可以失去氨, 合环状化生成 5, 10-甲炔基 FAH_4 (5,10-methenyl FAH_4)。

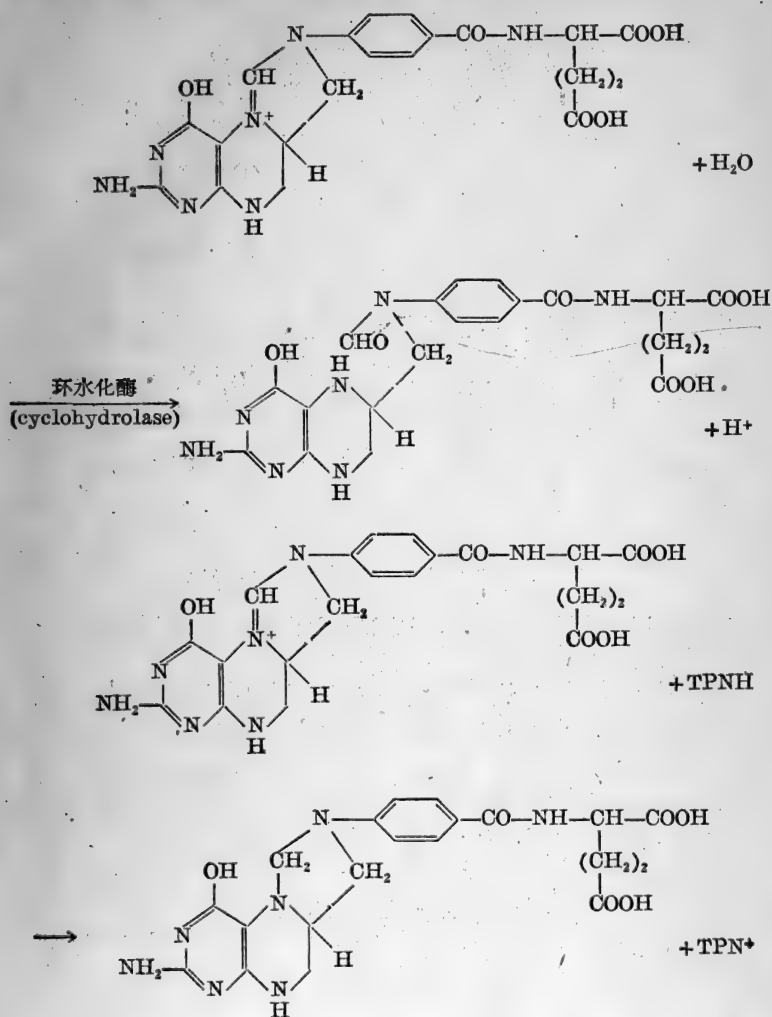


该化合物可自 5-CHO- FAH_4 (leucovorine citrovorum factor) 转变生成或化学合成, 在自然界也存在。

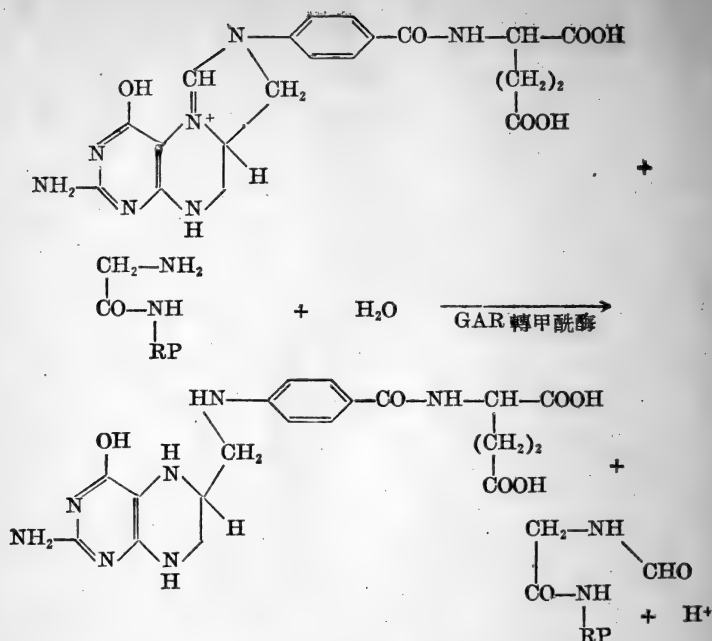


5. 由 5,10-甲炔 FAH_4 氢化变成 10-甲酰 FAH_4 , 或水合

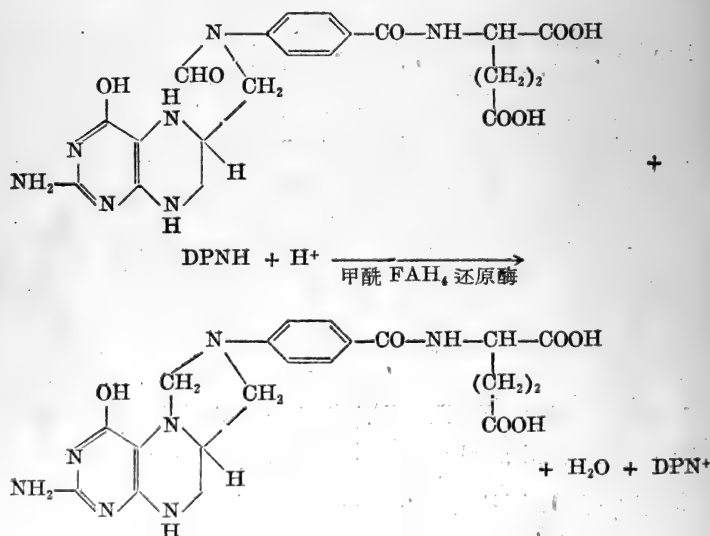
变为5,10-甲烯 FAH₄ (5,10-methylene FAH₄)。



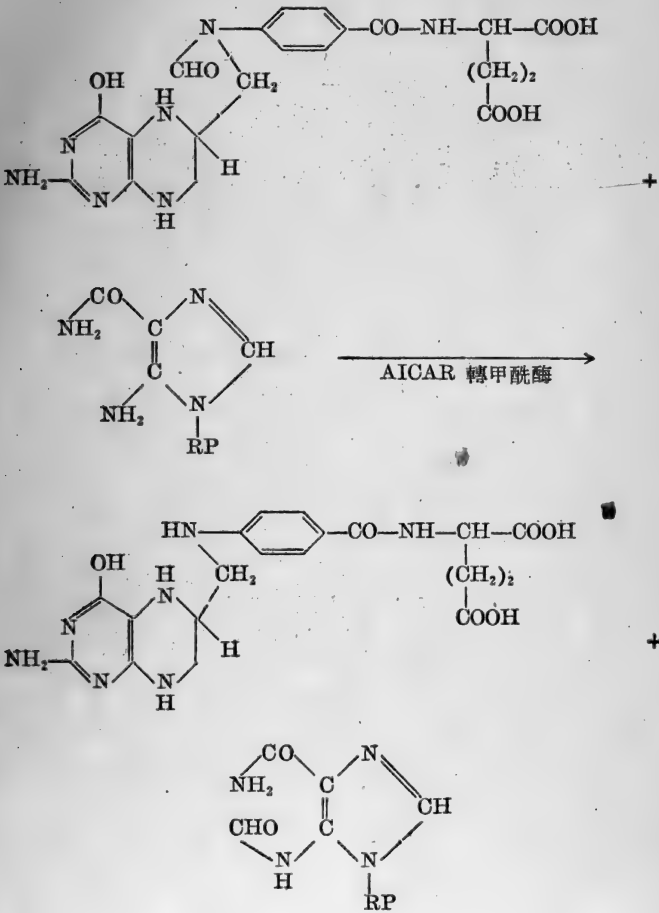
5,10-甲烯 FAH₄ 可以将第十位碳原子转至甘氨酸核 苷酸 (glycinamide ribotide, GAR), 然后产生甲酰甘氨酸核 苷酸 (formyl glycinamide ribotide, FGAR), 这是嘌呤生物合成 一个重要的前体物。



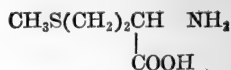
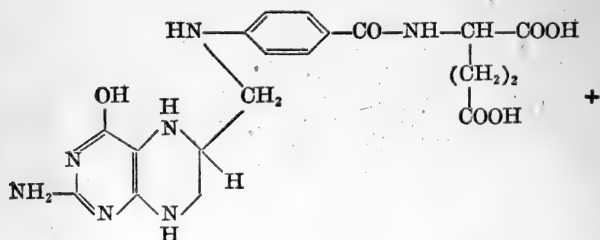
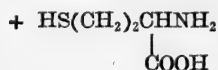
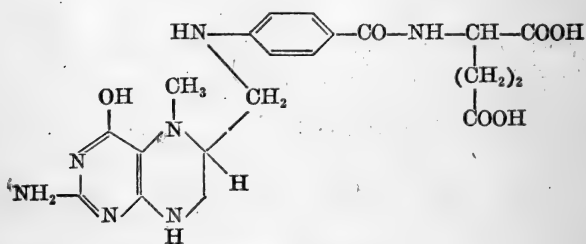
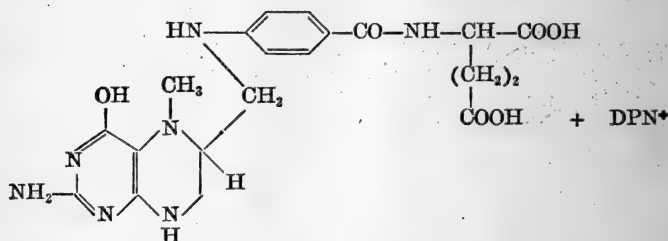
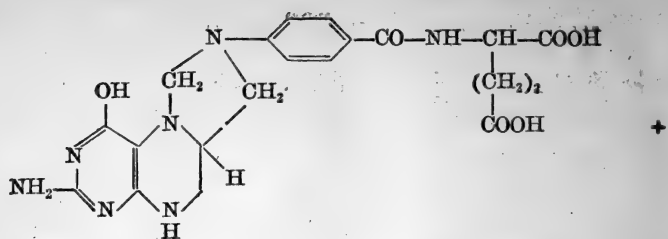
6. 10-甲酰 FAH₄ 可以还原和脱水变为 5, 10-甲烯 FAH₄。



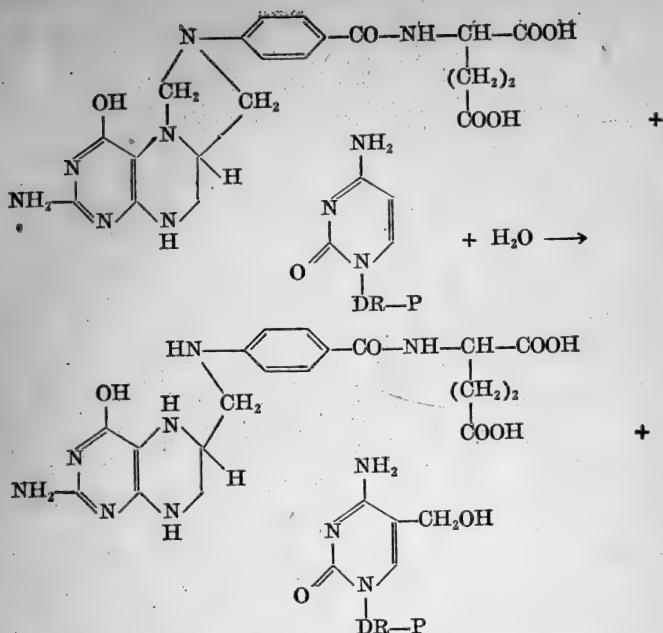
10-甲酰 FAH₄ 可以将第十位碳原子轉至氨基异吡唑甲酰胺核苷酸 (aminoimidazole carboxamide ribotide, AICAR), 然后变为甲酰 -AICAR, 后者为嘌呤合成的前身物及組氨酸生物合成的中間体。



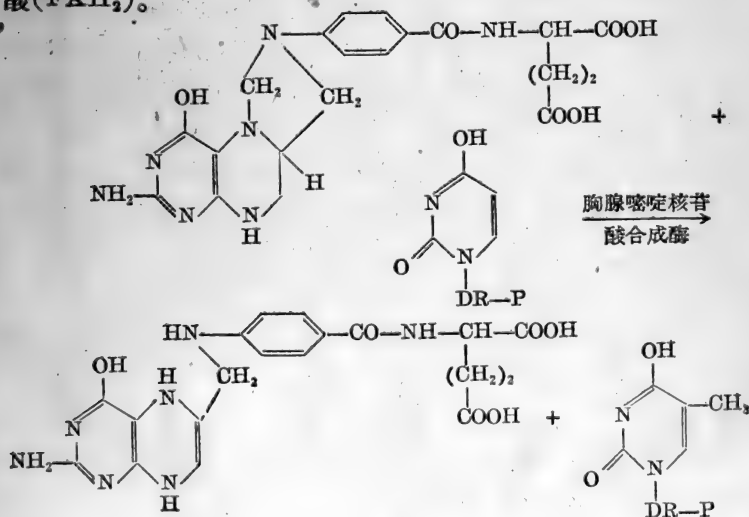
7. 5,10-甲烯 FAH₄ 可以还原为 5-甲基 FAH₄, 后者有运轉甲基至 homocysteine 生成蛋氨酸。維生素 B₁₂ 也参与这步轉甲基化过程。



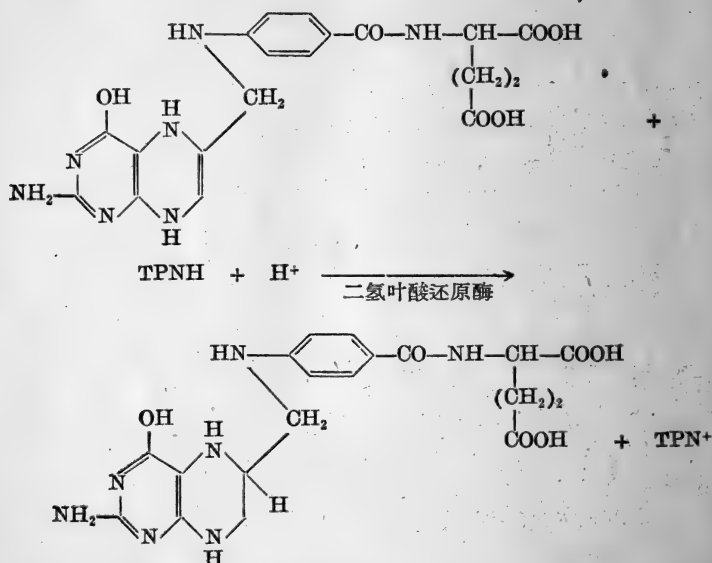
5,10-甲烯 FAH₄ 可将其桥碳轉給脫氧胞嘧啶核苷酸形成 5-甲基脫氧胞嘧啶核苷酸。



最后, 5,10-甲烯 FAH_4 中的桥碳及由叶酸环还原的两个氢原子, 可以轉至脫氧尿嘧啶核苷酸, 形成胸腺嘧啶核苷酸及二氢叶酸(FAH_2)。

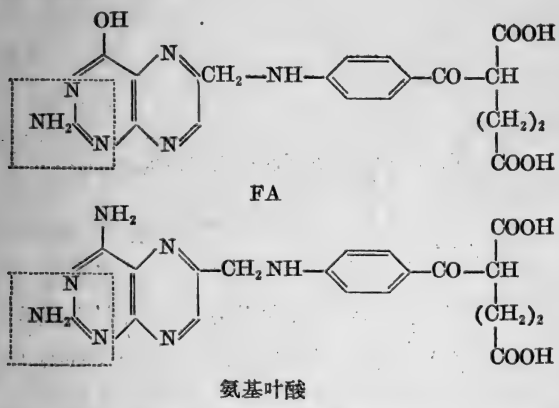


8. 二氢叶酸是最后一步反应的产物, 或者是自营养的(auto-trophic) 微生物新合成物质, 或是自食物叶酸还原为 FAH_4 , 有了 FAH_4 可以继续进行以上的一系列化学反应。



上面这一步生化反应在多种动物中占有重要的地位。而叶酸类抗代谢物能坚固地与二氢叶酸还原酶(dihydrofolic reductase)结合, 于是阻止了叶酸代谢环的进行, 这样就切断了 FAH_4 为嘌呤及胸腺嘧啶的合成, 最终影响了DNA的合成进行。Wahba 等^[47]发现除氨甲基叶酸的衍化物对大肠杆菌内的胸腺嘧啶合成酶有抑制作用外, 叶酸类抗代谢物别的作用尚未被探知。过去 Nihol 等^[37]认为叶酸类抗代谢物主要是阻断FA至CF的合成过程(见图10), 事实上CF在 FAH_4 系统中是一项不稳定的过程(loose term)。Broquist 等^[7]发现氨基叶酸的毒性, 可单独为 FAH_4 解除, 这就说明氨基叶酸阻断了FA至 FAH_4 的过程。Fisher^[26]曾以对氨基叶酸有耐药性的小鼠白血病细胞进行试验, 发现随着抗药性的增加, 二氢叶酸还原酶含量亦按比例升高。以上这些观察有力的证实了叶酸类抗代谢物主要是作用于二氢叶酸还原酶。

Werkheiser^[19] 曾用透析法发现氨基叶酸与二氢叶酸还原酶的结合力大于叶酸 10⁵ 倍。Baker^[2] 并认为氨基叶酸与酶结合是一种不可逆反应，这是由于叶酸上第四位的羧基，改换为氨基，因此变为一个强碱性，此碱性与酶的酸性部位自然结合的要坚固。见以下结构式内虚线部分。



关于叶酸类抗代谢物对核酸代谢的影响可参看图 10。

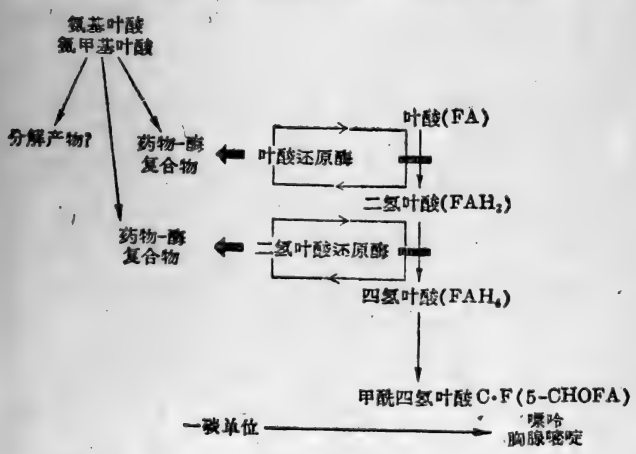


图 10 叶酸类抗代谢物对核酸代谢作用示意图^[34]

(四) 谷氨酰胺类抗代谢物 这类抗代谢物种类较少，常用者为偶氮丝氨酸及 DON，其化学结构见图 11；由于这类药物毒性较

代 謝 物	抗 代 謝 物
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NC}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \parallel \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>谷氨酰胺</p>	$\begin{array}{c} \text{N}_2\text{CHCOCH}_2\text{CHCOOH} \\ \parallel \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>偶氮絲氨酸</p>
	$\begin{array}{c} \text{N}_2\text{CHCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \parallel \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>DON</p>

图 11 谷氨酰胺类抗代谢物化学结构

大,因此在临床应用受到一定限制。虽然偶氮絲氨酸及 DON 在动物实验非常有效,但临床应用的價值不大,在理論研究上也有較重要的地位。偶氮絲氨酸可以干扰谷氨酰胺供应氨基給甲酰甘氨酸核糖-5-磷酸 (FGAR),在給过偶氮絲氨酸后的正常及肿瘤动物,均可见有 FGAR 的堆积现象。此外别的氨基供应也可为此化合物干扰:如由核糖磷加氨基形成 5-磷酸核酸胺 (5-PRA) 以及由嘌呤环加氨基形成鳥便嘌呤等。DON 与偶氮絲氨酸的作用机制相同 [33]。

偶氮絲氨酸及 DON 对核酸代谢的影响可参看图 12。

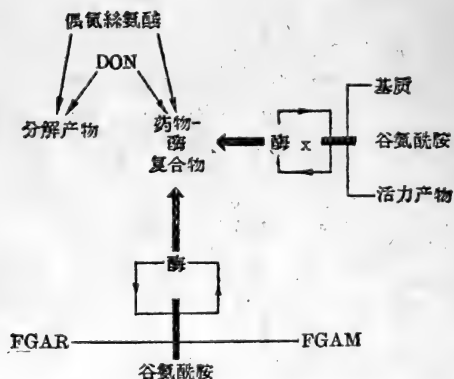


图 12 偶氮絲氨酸对核酸代谢示意图 [34]

(五) 磺胺药和乙氨嘧啶 自1935年^[25,50]发现磺胺的抑菌作用,可以被细菌的必需代谢物——对氨基苯甲酸(PABA)对抗后,一直对磺胺作用机制未能彻底的了解。近年由于叶酸在体内代谢过程了解的比较清楚,因此对磺胺的作用机制进一步的了解;磺胺与PABA有竞争性的对抗作用,微生物具有利用PABA合成叶酸的能力,由叶酸再转换为四氢叶酸及甲酰四氢叶酸,以上这些叶酸的衍化物对核酸代谢—碳转移上起着重要的作用,在高等动物不能直接利用PABA新合成叶酸,其叶酸的主要来源为维生素,因此磺胺药对微生物的作用要比对人的作用敏感。

另外一种新的有效抗疟药——乙氨嘧啶,经研究证明它主要影响叶酸至甲酰四氢叶酸的代谢过程,特别对寄生物的作用较人为敏感^[54]。此二药的作用机制可见图13。

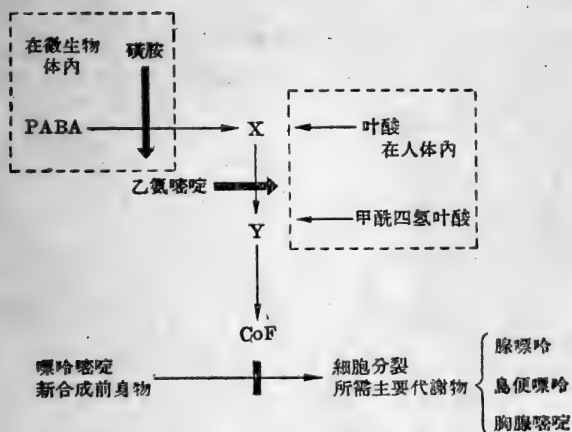


图13 磺胺及乙氨嘧啶作用机制示意图^[54]

三、結 束 語

本文初步讨论了一些抗代谢物对核酸代谢的影响。从上述材料可以看出研究的范围及内容均甚广,所用实验方法及材料不同,虽然在结果上尚有矛盾,但对了解抗代谢物的作用机制已有很大的帮助。近年来研究抗代谢物对核酸的影响,对进一步解释药物

作用机制已起了很大的作用。但值得注意的是，不仅是单一地孤立注意核酸方面，而应注意核酸与酶的关系。在叶酸抗代谢物的研究，观察到叶酸在 DNA 合成作用是依靠酶进行，而叶酸类抗代谢物能坚固地与酶结合，因而阻止了 DNA 的合成，由这示例也可说明结合酶的研究对解决药物作用机制是一个重要的研究途径。

抗代谢物的研究不仅使药理学的知识内容有所充实，而且对生物化学、病因学、免疫学的研究也起了一定的作用。这里也必须指出抗代谢物在临床上应用仍有其缺点：毒性大，疗效低，容易产生耐药性，今后怎样去选择一些作用特殊的抗代谢物，这些新的抗代谢物对正常组织或细胞很少甚至无损害作用，而且能有效地控制某一病理过程。还有赖于生物化学、生理学的知识积累，还应了解什么物质是体内特殊功能上的重要物质，进一步查明在病理状态下代谢物特别是核酸的特异性，以及当机体的某一主要代谢物在缺乏时有何特异征状，虽然在这方面的研究还很不够深入，但我们应寄以较大的希望^[53,54]。

参 考 文 献

- [1] Balis, M. E., Hylim, V. C., Coutas, M. K. and Hutchison, D. J., *Cancer Res.*, **18**: 440~444, 1958.
- [2] Baker, B. R., *Cancer Chemotherapy Report*, **4**: 1~10, 1959.
- [3] Baker, B. R., *Chemical and Engineering News (Sept.)*, **39**, 1961.
- [4] Baker, B. R., *Ibid.*, (Oct.), **49**, 1961.
- [5] Bieber, S., *Cancer Res.*, **21(2)**: 228~231, 1961.
- [6] Bosch, L., Harbers, E. and Heidelberger, C., *Cancer Res.*, **18**: 335~343, 1958.
- [7] Broquist, H. P., Fahrenbach, M. J., Brockman, J. A., Jr., Stokstad, E. L. R. and Jukes, J. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**: 3535~3536, 1951.
- [8] Brown, F. U. and Mandel, H. G., *Cancer Res.*, **2**: 284, 1958.
- [9] Burchenal, J. H., Murphy, M. L., Ellison, R. R., Sykes, M. P., Tan, T. C., Leone, L. A., Karnofsky, D. A., Craver, L. F., Daryon, H. W. and Rhoads, C. P., *Blood*, **8**: 965~999, 1953.
- [10] Calabresi, P. and Cardoso, S. S., *Cancer Res.*, **21**: 550, 1961.
- [11] Chaudhuri, N. K., Montag, B. L. and Heidelberger, C., *Cancer Res.*, **18**: 318~328, 1958.

- [12] Chaudhuri, N. K., Mukherjee, K. L. and Heidelberger, C., *Biochem. Pharmacol.*, **1**: 328~341, 1959.
- [13] Clarke, D. A., Philip, F. S., Sternberg, S. S., Stock, C. C., Elion, G. and Hitchings, G. G., *Cancer Res.*, **13**: 593~604, 1953.
- [14] Cohen, S. S., Flaks, J. G., Barner, H. D., Loeb, M. R. and Lichtenstein, J., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **44**: 1004~1112, 1958.
- [15] Curreri, A. R., Ansfield, F. J., McIver, F. A., Waisman, H. H. and Heidelberger, C., *Cancer Res.*, **18**: 478~484, 1958.
- [16] Danneberg, P. B., Montag, B. J. and Heidelberger, C., *Cancer Res.*, **18**: 329~334, 1958.
- [17] Davidson, J. D., *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3**: 15, 1959.
- [18] Delmonte, L. and Jukes, T. H., *Pharmacol. Review*, **4**: 91, 1962.
- [19] Duschinsky, R., Plevén, E. Malbica, J. and Heidelberger, C., *Abstr. Amer. Chem. Soc., Meeting Sept.*, p. 19c, 1957.
- [20] Duschinsky, R., Plevén, E. and Heidelberger, C., *J. Amer. Chem. Soc.* **79**: 4559~4560, 1957.
- [21] Edinoff, M. L., Knoll, J. E. and Klein, D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **71**: 274~275, 1957.
- [22] Elion, G. B., Hitchings, G. H. and Vander Werff, H., *J. Biol. Chem.*, **192**: 508~518, 1951.
- [23] Elion, G. B., Bieber, S. and Hitchings, G. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **60**: 297~303, 1954.
- [24] Farber, S., *New Eng. J. Med.*, **238**: 787~793, 1948.
- [25] Fildes, P., *Lancet*, **1**: 955~957, 1940.
- [26] Fisher, G. A., *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3**: 111, 1960.
- [27] Fodor, P. J., Donald, A., Clarke, D. A. and Oscar, B., *Cancer Res.*, **21**: 232~237, 1961.
- [28] Gerbart, J. C. and Pardee, A. B., *J. Biol. Chem.*, **237**: 891~896, 1962.
- [29] Hamilton, L. and Elion, G. B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **60**: 304~314, 1954.
- [30] Harris, R. J. C., *Biological approaches to Cancer chemotherapy*, p. 39~46, Academic Press, London & N. Y., 1961.
- [31] Jacobson, *Ibid.*, p. 149~166, 1961.
- [32] Lepage, G. A. and Maryanne, J., *Cancer Res.*, **21**: 642~649, 1961.
- [33] Mandel, H. G. and Latimer, R. G., *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3**: 40, 1959.
- [34] Mandel, N. G., *Pharmacol. Review*, **11**(4): 743~838, 1959.
- [35] Mandel, N. G., Inscoc, J. K., Maling, H. M. and Smith, P. K., *J. Pharmacol.*, **120**: 195~202, 1957.



S0011865

- [36] Michaelis, L. and Pochsterin, H., *Biochem. Z.*, **60**: 79~90, 1914.
- [37] Nichol, C. A. and Welch, A. D., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. N. Y.*, **74**: 403~411, 1950.
- [38] Prusoff, W. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **32**: 295~296, 1959.
- [39] Questel, J. H. and Wooldridge, W. R., *Biochem. J.*, **22**: 689~702, 1928.
- [40] Rabinowitz, J. D., In *The Enzymes*, ed. by P. D. Boyer, H. A. Lardy and K. Myrback, 2nd ed., Vol. 2. p. 185~252, Academic Press. N. Y., 1960.
- [41] Rich, M. A., Bolaffi, J. L., Knoll, J. E., Cheong, L. and Edinoff, M. L., *Cancer Res.*, **18**: 730~735, 1958.
- [42] Rutman, R. J., Cantarow, A. and Paschkis, K. E., *Cancer Res.*, **14**: 119~123, 1954.
- [43] Sartorelli, A. C. and Lepage, G. A., *Cancer Res.*, **18**: 1329~1335, 1958.
- [44] Sköld, O., *Biochim. Biophys. Acta*, **29**: 651, 1958.
- [45] Skipper, H. E., Thomson, J. R., Hutchison, D. J., Schabel, F. M. and Johnson, J. J., Jr., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. N. Y.*, **95**: 135~138, 1957.
- [46] Todd, A. R., in "Chemistry of Enzymes in Cancer", p. 19, Charles & Thomas, USA, 1961.
- [47] Wahba, A. J. and Friedkin, M., *J. Biol. Chem.*, **236**: 11~12, 1961.
- [48] Welch, A. D., *Cancer Res.*, **21(11)**: 1475~1490, 1961.
- [49] Werkheiser, W. C., *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3**: 72, 1959.
- [50] Woods, D. D., *Brit. J. Exptl. Path.*, **21**: 74~90, 1940.
- [51] Woolley, D. W., *A study of antimetabolites*, p. 1~3, John Wiley & sons N. Y., 1952.
- [52] Woolley, D. W., *J. Clin. Pharmacol. & Therap.*, **1(5)**: 556~569, 1960.
- [53] Woolley, D. W., "Progress in Drug Research", p. 613~636, Birk Hauser Verlas Basel, 1960.
- [54] 王振綱, 抗代謝物研究的新进展, *生理科学进展*, **4(4)**: 381~396, 1962。

6417125

58.173083

197

田桂英 一九六五年四月六日 65.4.2

吳曉明 一九六五年十月十日 65.11.7

王德芳 八月六日 66.8.6

58.173083

197

注意

6417125

- 1 借書到期請即還。
- 2 請勿在書上投書圈點，折角。
- 3 借書圖書如有污損遺失，經情形須照價賠償。

統一書號 13119·560

定 价 2.00 元